



Dynamique éco-évolutive de deux ascidies congénériques et interfertiles, l'une indigène et l'autre introduite, dans leur zone de sympatrie

Sarah Bouchemousse

► To cite this version:

Sarah Bouchemousse. Dynamique éco-évolutive de deux ascidies congénériques et interfertiles, l'une indigène et l'autre introduite, dans leur zone de sympatrie. Biodiversité. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2015. Français. NNT : 2015PA066604 . tel-01337034

HAL Id: tel-01337034

<https://theses.hal.science/tel-01337034>

Submitted on 24 Jun 2016

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

THESE DE DOCTORAT DE L'UNIVERSITE PIERRE ET MARIE CURIE

Ecole Doctorale

**Sciences de la Nature et de l'Homme : Evolution et Ecologie
UPMC-MNHN**

Présentée par

Sarah BOUCHEMOUSSE

Pour obtenir le grade de

Docteur de l'Université Pierre et Marie CURIE

Spécialité Diversité du Vivant

**Dynamique éco-évolutive de deux ascidies
congénériques et interfertiles, l'une indigène et l'autre
introduite, dans leur zone de sympatrie**

Soutenue le 11 décembre 2015

Devant le jury composé de :

Dr. Pierre BOUDRY, Directeur de Recherche, Ifremer, Brest

Pr. Xavier TURON, Professeur, Centre d'études avancées de Blanes

Dr. Pierre-Alexandre GAGNAIRE, Chargé de Recherche, CNRS, Sète

Dr. John D.D. BISHOP, Chercheur Associé, MBA, Plymouth

Pr. Sarah SAMADI, Professeur, MNHN, Paris

Dr. Frédérique VIARD, Directrice de Recherche, CNRS, Roscoff

Rapporteur

Rapporteur

Examineur

Examineur

Examinatrice

Directrice de thèse

- Table des matières -

Introduction générale	1
I. Les aires de distribution des espèces : des entités en constante évolution	1
1.1 Des modifications d'aires de distribution sur des grandes échelles de temps	2
1.2. ... mais aussi sur des échelles de temps courtes voire très courtes	3
II. Les introductions biologiques : des laboratoires naturels pour étudier les conséquences des changements d'aire de distribution et des contacts secondaires	6
2.1. Typologie du processus d'introduction biologique	6
2.2. Le « paradoxe de l'invasion »	6
2.3. Les introductions biologiques en milieu marin	9
III. Les conséquences écologiques et évolutives des contacts secondaires lors d'introductions biologiques	13
3.1. Chevauchement des niches écologiques et interactions compétitives	13
3.2. Flux de gènes interspécifiques entre espèces non isolées reproductivement	14
3.3. Impact d'évènements anciens sur l'interprétation des patrons d'hybridation contemporains	18
IV. Présentation des modèles d'étude : deux taxons du complexe d'espèce <i>Ciona intestinalis</i> (Ascidacea)	22
4.1. De <i>Ciona intestinalis</i> à <i>C. robusta</i> (<i>C. intestinalis</i> type A) et <i>C. intestinalis</i> (<i>C. intestinalis</i> type B)	24
4.2. Des zones d'ombre rendant compte d'une histoire évolutive complexe	28
4.3. Une zone de sympatrie unique (en Manche) dans laquelle des hybridations semblent possibles	30
4.4. Les connaissances sur l'écologie des deux espèces sont rares et indirecte	31
V. Objectifs de la thèse et structure du document	34
 Chapitre 1 – Dans quel type de communautés sont établies les deux espèces au sein des habitats portuaires ?	 36
I. Contexte de l'étude	36
II. Méthodes expérimentales et analyses des données	42
2.1. Dynamique d'établissement des communautés de faune sessile dans les habitats portuaires bretons	42
2.2. Caractérisation des peuplements d'ascidies naturellement établis <i>in situ</i> et estimation des densités de populations des espèces <i>Ciona robusta</i> et <i>C. intestinalis</i>	47
III. Résultats	50
3.1. Comparaison de la faune sessile établie au bout d'un an entre ports et périodes d'étude	50
3.2. Caractérisation des peuplements d'ascidies établis sous les pontons	54
3.3. Comparaisons des densités des populations de <i>Ciona robusta</i> et <i>C. intestinalis</i> entre ports et entre dates d'échantillonnage	58
IV. Discussion	60
4.1. Synthèse des résultats obtenus	60
4.2. Les ascidies : une classe dominante de la faune sessile des habitats portuaires qui témoigne de l'importance des processus d'homogénéisation biotique	60
4.3. Des communautés globalement homogènes mais avec des variations locales : un effet des conditions environnementales ?	63
4.4. Quelles méthodes utiliser pour répertorier les espèces d'ascidie non-indigènes ? Enjeux et limites	66
4.5. <i>C. robusta</i> et <i>C. intestinalis</i> : deux espèces présentes et abondantes le long des côtes bretonnes	69
Annexes	72

Chapitre 2 – Dans quel type de communautés sont établies les deux espèces au sein des habitats portuaires ?	87
I. Contexte et synopsis de l'étude	87
II. Article 1: « Similar recruitment timing but with differential success between one alien tunicate and its native congener - competitive interactions at early stages »	91
Sarah Bouchemousse, Laurent Lévêque and Frédérique Viard	
Supplementary Information	109
Chapitre 3 – Quel est le potentiel d'hybridation entre les deux espèces dans la zone de sympatrie ?	118
I. Contexte et synopsis de l'étude	118
II. Article 2 : « Co-occurrence and reproductive synchrony do not ensure hybridization between an alien tunicate and its intersterile native congener »	122
Sarah Bouchemousse, Laurent Lévêque, Guillaume Dubois and Frédérique Viard	
Supplementary Information	142
Chapitre 4 – Quelle est l'importance relative des flux de gènes interspécifiques contemporains et historiques ?	149
I. Contexte et synopsis de l'étude	149
II. Article 3 : « Past and contemporary introgression between two strongly differentiated <i>Ciona</i> species as revealed by a post-genomic SNP panel »	153
Sarah Bouchemousse, Cathy Haag-Liautard, Nicolas Bierne and Frédérique Viard	
Supplementary Information	177
Chapitre 5 – Quelle est l'histoire démographique et migratoire des deux espèces à l'échelle mondiale ?	191
I. Contexte et synopsis de l'étude	191
II. Article 4 : « Contrasting global genetic patterns in two biologically similar, widespread and invasive <i>Ciona</i> species (Tunicata, Ascidiacea) »	195
Sarah Bouchemousse, John D.D. Bishop and Frédérique Viard	
Supplementary Information	214
Conclusion & Perspectives	224
I. Synthèse des résultats	224
II. Thème 1 : Etude des interactions compétitives et du devenir des deux espèces dans leur zone de sympatrie	226
III. Thème 2 : Analyse couplée de la diversité intra- et interspécifique dans les habitats portuaires	229
IV. Thème 3 : Identifier les mécanismes d'isolement reproductif agissant in situ entre <i>C. intestinalis</i> et <i>C. robusta</i>	231
V. Thème 4 : (Ré-) Evaluer le statut d'espèces au sein du genre <i>Ciona</i> par des approches moléculaires	234
Références bibliographiques (hors articles)	239
Glossaire	252
Liste des tableaux (hors articles)	254
Liste des figures (hors articles)	255
Liste des encadrés	260
Remerciements	261

- Introduction générale -

Au cours de cette thèse, je me suis intéressée aux conséquences éco-évolutives du contact secondaire de deux espèces d'ascidies appartenant au genre *Ciona*, l'une indigène, l'autre non-indigène, dans la seule zone de contact confirmée à ce jour entre les deux taxons. Ces deux espèces, par leur histoire et leurs propriétés, témoignent des effets des changements d'aires de distribution des espèces à différentes échelles de temps et d'espace. Elles offrent en particulier l'opportunité d'étudier la coexistence, le potentiel d'hybridation et l'importance des flux de gènes interspécifiques entre espèces indigènes et introduites. Afin de mettre en perspective mon travail de thèse, je tacherai dans cette introduction de dresser un bref panorama des connaissances concernant les changements d'aires de distribution d'espèces et leurs implications éco-évolutives, avec un « focus » particulier sur le cas de contacts secondaires issus de processus d'introductions biologiques, avant de présenter les modèles biologiques qui ont fait l'objet de ce travail de thèse.

I. Les aires de distribution des espèces : des entités en constante évolution

L'aire de distribution d'une espèce correspond à la zone de territoire occupée par l'ensemble des populations* de l'espèce étudiée. Leur définition, complexe en écologie, est généralement liée aux patrons d'abondance en termes de nombre d'individus à une échelle spatiale donnée. Par exemple, Brown (1984) distingue trois grands modèles de distribution d'espèce en fonction de la densité des populations en nombre d'individus (Figure I.1) où le maximum d'abondance dans la zone géographique représente la situation optimale de développement de l'espèce (e.g. distribution normale, Figure I.1.A). Les aires de distribution d'espèce sont généralement délimitées par l'action de :

- facteurs abiotiques qui imposent des barrières physiques à la dispersion (par exemple des montagnes, étendues d'eau ou gyres océaniques), ou qui génèrent un stress physiologique (par exemple lié à la température, la composition du substrat, etc.) définissant les limites de résistance des organismes à un facteur donné
- facteurs biotiques, tels que les processus de compétition ou de prédation, qui localement jouent sur les marges d'aires de distribution (Brown *et al.* 1996).

La distribution des macroalgues brunes de l'ordre des fucales en milieu intertidal rocheux est un exemple illustrant l'importance de ces facteurs : des expériences de transplantation et

d'exclusion ont montré que la limite supérieure de la distribution des fucales s'explique par leur capacité à supporter la dessiccation (stress abiotique) tandis que la limite inférieure est régie par des processus de compétition où l'espèce dominante dans une zone est celle présentant le taux de croissance le plus rapide (Schonbeck & Norton 1978, 1980). Le même schéma de distribution est proposé pour d'autres gradients environnementaux tels que les gradients d'altitude et d'aridité en milieu terrestre ou les gradients bathymétriques en milieu marin pour lesquels d'un côté la distribution d'une espèce est régie par un stress abiotique croissant et de l'autre côté par l'impact de compétiteurs ou prédateurs biologiques (Brown *et al.* 1996).

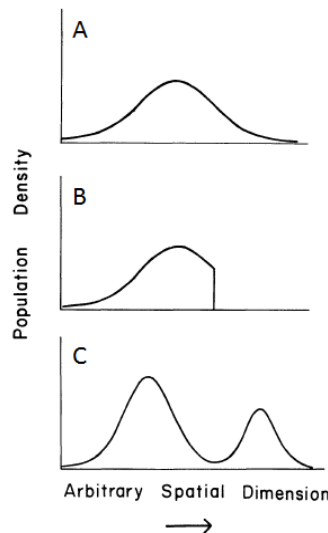


Figure 1.1. **Modèles de distribution d'une espèce en fonction de la densité des populations en nombre d'individus le long d'un transect géographique fictif.** A) Distribution normale où l'abondance des individus est plus forte dans les populations centrales car en situation de développement optimal par rapport aux populations en périphérie. B) Distribution tronquée due à une modification abrupte des conditions biotiques et/ou abiotiques défavorables au développement ou à la dispersion de l'espèce. C) Distribution multimodale due à une discontinuité des conditions biotiques et/ou abiotiques favorables au développement de l'espèce. Figure tirée de Brown (1984).

La façon dont se distribuent les espèces et les facteurs responsables de ces distributions sont l'objet d'une discipline scientifique, la biogéographie*. Comprendre les facteurs responsables des distributions des espèces est complexe car ces aires de distributions sont dynamiques et les changements d'aires de distribution peuvent subvenir à différentes échelles de temps et d'espace, en fonction des processus sous-jacents (voir Wilson *et al.* (2009) pour une revue) :

- des processus d'expansions naturelles et graduelles dans le prolongement de l'aire initiale de distribution de l'espèce peuvent opérer sur des échelles de temps longues (plusieurs milliers ou millions d'années); on parle de diffusion, d'expansion périphérique ou encore de déplacements d'aires quand c'est l'ensemble de l'aire de distribution qui se déplace en réponse à des modifications géologiques ou climatiques majeures ;
- des modifications rapides des conditions environnementales ainsi que le transport d'espèces par les activités humaines (qui ainsi supprime les effets des barrières naturelles à la dispersion) peuvent aussi entraîner des changements d'aires de distribution sur une échelle de temps courte (quelques décennies ou centaines d'années) à très courte (inférieure à une année).

Quelques exemples de ces modifications d'aires sont donnés ci-dessous

1.1. Des modifications d'aires de distribution sur de grandes échelles de temps

Au cours de son histoire, la Terre a été marquée par de grands événements géologiques et climatiques durant lesquels les aires de distribution des espèces aussi bien terrestres (Hewitt 2000; Hewitt 2004) que marines (Vermeij 1991; Palumbi 1994; Briggs 2003) ont été fortement modifiées. Des changements majeurs d'aires de distribution ont par exemple été provoqués par l'alternance des périodes glaciaires et interglaciaires du Quaternaire, depuis 2.6 millions d'années par cycles réguliers de 100,000 années (Hewitt 2011). Ces changements ont été mis en évidence par de nombreuses études de phylogéographie* et de paléobiologie* (Avice 1992; Hewitt 2004; Vermeij 2005); les périodes glaciaires sont généralement caractérisées par une expansion des aires de distribution des espèces d'affinité polaire ou d'altitude et la réduction des aires de

distribution des espèces tempérées dans des refuges caractérisés par des conditions abiotiques favorables à leur survie (voir Maggs *et al.* (2008) pour une revue concernant le milieu marin lors du dernier maximum glaciaire en Atlantique Nord; et Waltari *et al.* (2007) pour un exemple en milieu terrestre en Amérique du Nord). Des changements inverses se produisent ensuite lors des périodes interglaciaires, et des contacts entre populations issues de différents refuges peuvent avoir lieu lors de la phase d'expansion. L'algue brune *Fucus serratus* est un cas illustrant ces changements d'aires de distribution depuis le dernier maximum glaciaire (LGM), il y a environ 20 000 ans. Une étude phylogéographique a en effet montré que la recolonisation des milieux intertidaux rocheux de l'Atlantique Nord-Est s'était réalisée (en l'espace de 20,000 ans) à partir de trois refuges glaciaires identifiés au Sud-Ouest de l'Irlande, en Manche Occidentale et dans la péninsule Ibérique (Figure 1.2; Hoarau *et al.* 2007).

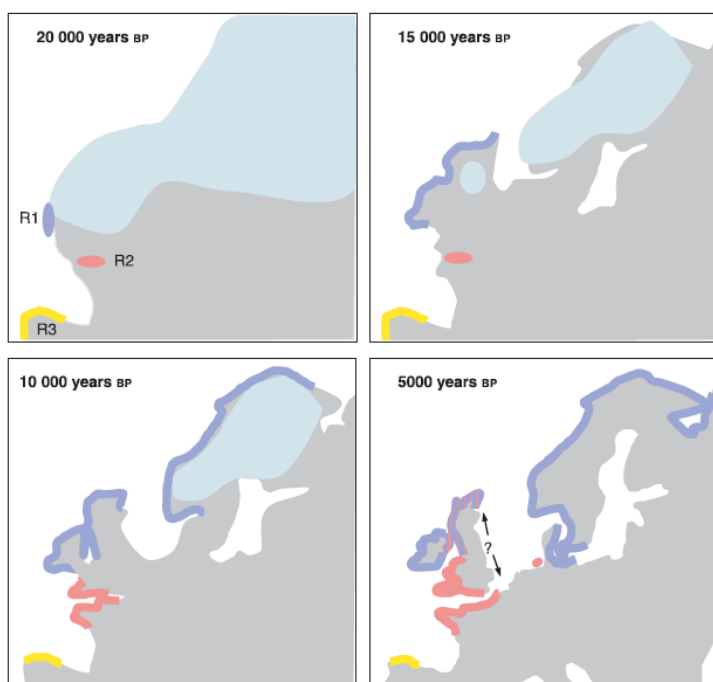


Figure 1.2. **Histoire de la recolonisation de l'espèce algale *Fucus serratus* en Europe** depuis le dernier maximum glaciaire. Les lettres R indiquent les trois refuges, et les couleurs associées, les voies de recolonisation depuis ces refuges. La zone de couleur bleu clair délimite la zone de permafrost se réduisant graduellement depuis la fin du dernier maximum glaciaire jusqu'à sa disparition complète de nos jours. La zone indiquée par un « ? », est caractérisée par un trop faible échantillonnage, et n'a pas été prise en compte dans ce scénario de recolonisation. Figure tirée de Hoarau *et al.* (2007).

Sur la base de la distribution géographique des haplotypes* mitochondriaux, du taux d'expansion de l'espèce (estimé à 0.5 km/an) et de la diminution graduelle du permafrost, les auteurs ont conçu un scénario hypothétique de recolonisation à partir de ces refuges (Figure 1.2) : par exemple, l'expansion au nord de l'Europe (*i.e.* Norvège, îles Shetland, etc.) se serait déroulée dès la fin du LGM en l'espace de 10,000 ans, à partir du refuge situé au Sud-Ouest de l'Irlande ; l'expansion de l'espèce au Sud de l'Angleterre et en Bretagne Sud aurait quant à elle débutée plus tardivement avec l'ouverture de la Manche, à partir d'un lac marin jusqu'alors isolé. Les données suggèrent également un contact entre les populations issues des refuges R1 et R2 (Figure 1.2) dans les îles britanniques, contact résultant de ces différentes vagues de recolonisation.

Ces modifications d'aires durant le Quaternaire ont favorisé de nombreux contacts entre espèces et entre populations divergentes, à l'origine de zones hybrides actuelles (Hewitt 2011).

1.2.... mais aussi sur des échelles de temps courtes voire très courtes

Les changements des conditions environnementales peuvent également opérer à des échelles de temps plus resserrées. Parmi les effets du changement climatique actuel sur l'environnement marin, on notera par exemple un taux d'accroissement particulièrement élevé des températures des eaux de surface ou encore une augmentation de la fréquence des événements climatiques extrêmes tels que des vagues de chaleur ou des tempêtes. Ces

modifications climatiques peuvent altérer la distribution des espèces, soit avec des déplacements d'aires, soit avec des modifications de la surface de l'aire de distribution sur quelques décennies (Parmesan 2006). De tels effets ont par exemple été documentés lors d'un suivi, mené sur 20 ans, d'une communauté de poissons en Tasmanie (Figure I.3; Bates *et al.* 2014): un effet dit de « tropicalisation » de ces communautés a été observé avec un accroissement exponentiel de l'abondance des espèces ayant une affinité pour les eaux chaudes (e.g. *Parma microlepis*; Figure I.3.A) et une apparition de nouvelles espèces dont les limites d'aires sont normalement à des latitudes plus faibles (i.e. déplacement ou expansion d'aires de quatre espèces; Figure I.3.B).

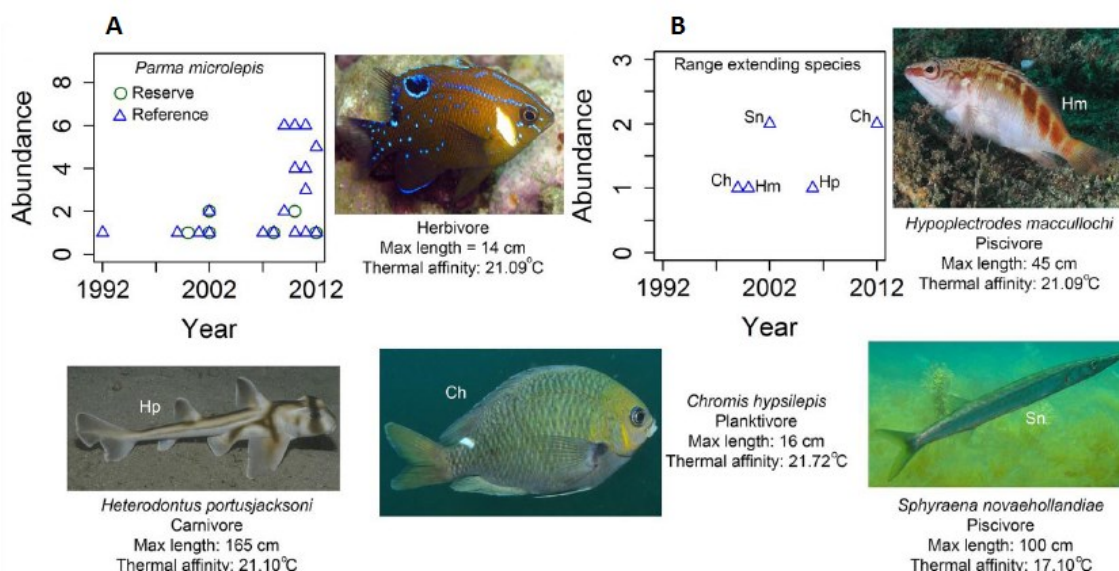


Figure I.3. **Modification d'abondance de 5 espèces de poissons observées entre 1992 et 2012, en Tasmanie.** Le graphique de gauche (A) montre les changements pour l'espèce *Parma microlepis* d'affinité d'eaux chaudes et le graphique de droite (B) ceux correspondant à 4 espèces de poissons occupant habituellement des habitats à des latitudes plus faibles. Figure extraite de la figure S5 de Bates *et al.* (2014)

Les introductions biologiques* (Cf. section II pour une présentation détaillée) sont également à l'origine de profondes modifications des aires de distribution des espèces. Les activités humaines responsables de ces processus transportent les espèces bien en dehors de leur aire de distribution naturelle engendrant des expansions d'aires souvent à grande échelle et sur des périodes de temps extrêmement courtes. Le cas de l'algue brune *Sargassum muticum* originaire des côtes d'Asie orientale (i.e. Japon, Corée, Chine) et introduite vraisemblablement via des importations de l'huître creuse *Crassostrea gigas* illustre la rapidité de ces processus d'expansion (Figure I.4; Engelen *et al.* 2015). Cette espèce a été répertoriée pour la première fois en dehors de son aire de distribution naturelle dans les années 1940 en Colombie Britannique, point d'introduction à partir duquel elle a ensuite colonisé la côte nord-américaine jusqu'au Mexique en l'espace de 50 ans. Il en est de même en Europe où sa première observation a été documentée dans les années 1970 en Manche, zone à partir de laquelle *S. muticum* aurait colonisé la majeure partie des habitats rocheux des côtes norvégiennes jusqu'au Portugal en l'espace de 30 ans. Actuellement, cette espèce semble poursuivre son expansion, avec une présence récemment documentée en 2013 en Afrique du Nord (Sabour *et al.* 2013).

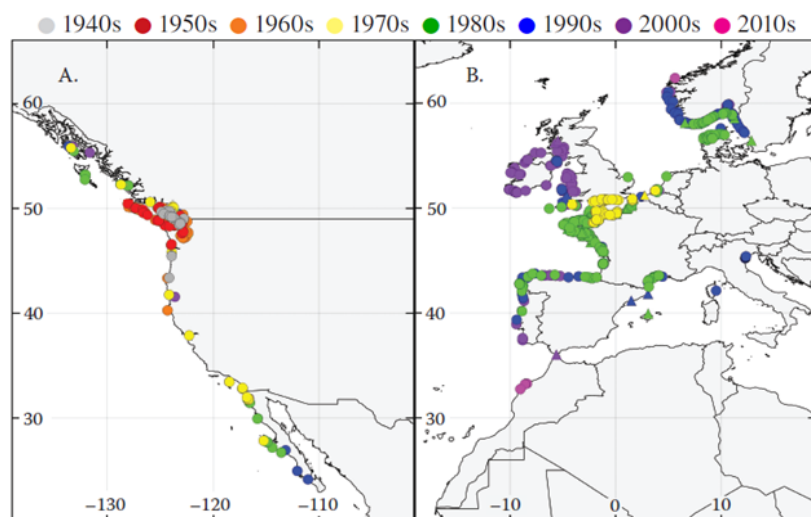


Figure 1.4. **Expansion de *Sargassum muticum* en Amérique du Nord (A) et en Europe (B)**, deux régions d'introduction de cette algue brune originaire d'Asie. Chaque point indique la présence de l'algue. Le code couleur indique la date (décennie) de première observation de l'espèce. Les triangles, sur les côtes méditerranéennes indiquent des spécimens trouvés à l'état de thalles dérivants. Figure tirée d'Engelen *et al.* (2015).

Il faut par ailleurs noter que les différents processus discutés plus haut, changements environnementaux (sur le long ou le court terme) ou introductions biologiques, ne sont pas indépendants. Le réchauffement climatique actuel pourrait par exemple permettre une installation facilitée pour les espèces transportées par l'homme et originaires de provinces biogéographiques plus chaudes que celles dans lesquelles elles sont transportées (Carlton 2000; Pancucci-Papadopolou *et al.* 2012).

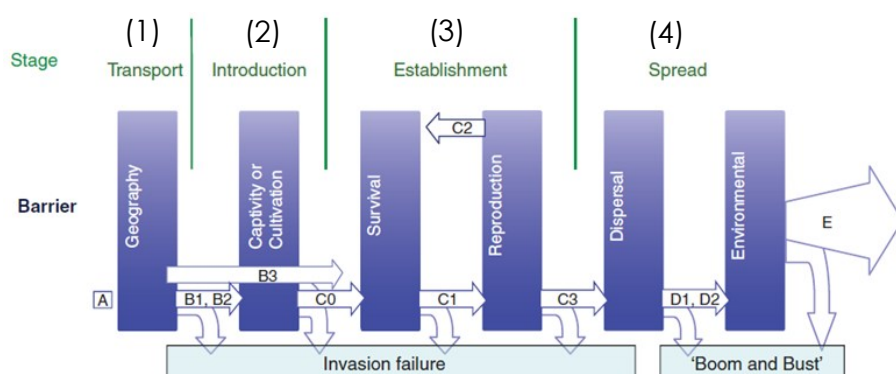
Les conséquences de ces modifications d'aires de distribution des espèces sont multiples, avec par exemple des changements de structure et de fonctionnement des écosystèmes ou de diversité des communautés (Grosholz 2002). Une autre conséquence majeure qui est peut-être moins étudiée (ou moins prise en compte) est la remise en contact (*i.e.* contacts secondaires) d'espèces proches physiologiquement, écologiquement et/ou évolutivement qui étaient auparavant en situation de parapatricie* ou d'allopatricie*. Pourtant, ces cas ne semblent pas être rares. En effet, dans une récente étude, basée sur des modèles bio-climatiques, Krosby *et al.* (2015) ont estimé que 6.4% des paires d'espèces allopatriques, au sein des groupes taxonomiques considérés dans leur étude (oiseaux, mammifères et amphibiens du continent américain), ont de fortes probabilités d'être en contact du fait du changement climatique actuel. Dans ce contexte, les processus d'introductions biologiques offrent également des cas d'études particulièrement intéressants car 1) les conséquences éco-évolutives de la remise en contact entre espèces peuvent être observées en temps réel et quelque fois dès le début du processus ; 2) ils contribuent à « brouiller » les patrons historiques, y compris dans la définition même des aires de distribution des espèces (*i.e.* espèces cryptogéniques*; voir section II).

II. Les introductions biologiques : des laboratoires naturels pour étudier les conséquences des changements d'aire de distribution et des contacts secondaires

2.1. Typologie du processus d'introduction biologique

Dans sa définition la plus simple, une introduction biologique est définie par le transport d'une espèce, du fait d'activités humaines, depuis son aire de distribution naturelle dans une région dans laquelle elle n'avait jamais été présente. Les autres termes que j'emploierai dans ce manuscrit (espèce non-indigène, espèce introduite, invasions biologiques) sont définis dans le glossaire. Il faut en effet remarquer qu'il existe une terminologie très diversifiée et source de nombreux débats dans ce domaine (Colautti & MacIsaac 2004; Colautti & Richardson 2009). Il en est de même pour les processus sous-jacents : de nombreux travaux scientifiques ont cherché à décrire les différentes étapes décrivant une introduction biologique et conduisant *in fine* à ce qu'il est convenu d'appeler le « succès d'introduction » d'une espèce (e.g. Vermeij 1996; Williamson & Fitter 1996; Kolar & Lodge 2001; Colautti *et al.* 2006). Néanmoins, ils ne décrivent souvent que partiellement la réalité d'un processus extrêmement complexe.

Dans un souci d'unifier les différentes visions relatives à ces processus d'introduction biologique, Blackburn *et al.* (2011) les ont définies et schématisées de la façon suivante : pour qu'une espèce introduite s'intègre avec succès dans un nouvel environnement, elle doit « traverser » toute une série de barrières physiques et/ou environnementales à travers une succession d'étapes (Figure 1.5) : elle doit (1) survivre durant son transport depuis son aire de distribution naturelle, (2) être relâchée volontairement ou accidentellement dans son nouvel environnement, (3) rencontrer des conditions favorables à sa survie et se reproduire pour fonder une population durable et (4) coloniser des territoires et se reproduire au-delà de son point d'introduction initial.



Category	Definition
A	Not transported beyond limits of native range
B1	Individuals transported beyond limits of native range, and in captivity or quarantine (i.e. individuals provided with conditions suitable for them, but explicit measures of containment are in place)
B2	Individuals transported beyond limits of native range, and in cultivation (i.e. individuals provided with conditions suitable for them but explicit measures to prevent dispersal are limited at best)
B3	Individuals transported beyond limits of native range, and directly released into novel environment
C0	Individuals released into the wild (i.e. outside of captivity or cultivation) in location where introduced, but incapable of surviving for a significant period
C1	Individuals surviving in the wild (i.e. outside of captivity or cultivation) in location where introduced, no reproduction
C2	Individuals surviving in the wild in location where introduced, reproduction occurring, but population not self-sustaining
C3	Individuals surviving in the wild in location where introduced, reproduction occurring, and population self-sustaining
D1	Self-sustaining population in the wild, with individuals surviving a significant distance from the original point of introduction
D2	Self-sustaining population in the wild, with individuals surviving and reproducing a significant distance from the original point of introduction
E	Fully invasive species, with individuals dispersing, surviving and reproducing at multiple sites across a greater or lesser spectrum of habitats and extent of occurrence

Figure 1.5. Schéma et tableau catégorisant les différentes étapes du succès d'une introduction biologique selon Blackburn *et al.* (2011). Ce schéma théorique catégorise les processus d'introduction biologique en fonction des barrières entravant le succès d'une espèce (« barrier » ; terme généralement utilisé dans la communauté scientifique étudiant le milieu terrestre) et en fonction d'étapes décrivant le processus (« stage » ; terme généralement utilisé en milieu marin). Figure tirée de Blackburn *et al.* (2011).

2.2. Le « paradoxe de l'invasion »

Au-delà de la description du processus d'introduction, une question de recherche centrale, y compris pour une meilleure gestion des introductions biologiques, est d'élucider les

mécanismes permettant la réussite d'une introduction biologique, *i.e.* le passage de toutes les étapes décrites dans la Figure 1.5 jusqu'à l'installation durable de l'espèce non-indigène dans la nouvelle région où elle a été transportée. En effet, il n'est pas évident à première vue de comprendre comment une espèce « réussit » dans un environnement dans lequel elle n'a jamais évolué ; cette question a été résumée sous le terme de « paradoxe de l'invasion » par Sax & Brown (2000).

Plusieurs facteurs ont été proposés pour expliquer ce paradoxe (Encadré 1). Ils comprennent des facteurs intrinsèques (modalités de reproduction, stratégies démographique, etc.) ou extrinsèques (histoire d'introduction, absence de prédateur, etc.) à l'espèce. Naturellement, ces facteurs peuvent contribuer conjointement au succès d'introduction durable d'une espèce introduite dans un nouvel environnement (Geller *et al.* 2010). Par exemple, le crabe vert *Carcinus maenas*, originaire des côtes de l'Atlantique Nord-Est, a été introduit le long des côtes de l'Atlantique Nord-Ouest dans des eaux caractérisées par des températures plus froides que celles de son aire d'origine (Audet *et al.* 2003). Des introductions provenant de multiples populations sources (Roman 2006) couplées à une forte pression en propagules* (Blakeslee *et al.* 2010), une forte plasticité phénotypique (Edgell & Hollander 2011) et une très longue durée de vie larvaire (80 jours; Shanks *et al.* 2003) auraient conjointement contribué à la réussite d'établissement de *C. maenas* dans sa zone d'introduction et de son expansion en Atlantique Nord-Ouest.

On notera que dans la vision proposée par Blackburn *et al.* (2011), et que d'une façon générale, lors de l'étude du paradoxe de l'invasion, les interactions entre facteurs écologiques et évolutifs ou entre les facteurs intrinsèques et extrinsèques évoqués plus haut, sont peu considérées. Il y a cependant des exceptions notables : par exemple les travaux de Saul & Jeschke (2015) qui examinent les « capacités » eco-évolutives d'espèces indigènes et non-indigènes (mesurées par exemple par un degré de proximité phylogénétique et de traits phénotypiques), à répondre à des modifications d'interactions proies-prédateurs. Facon et collaborateurs (2006) soulignent par ailleurs que l'adéquation entre les propriétés de l'espèce introduite et son nouvel environnement joue un rôle clé dans le processus d'invasion. Quatre scénarios sont proposés (Figure 1.6): un scénario considère une situation d'adéquation initiale et l'expansion est alors sous la dépendance du taux de migration de l'espèce introduite (cas a), trois scénarios considèrent une situation d'inadéquation initiale évoluant vers une situation d'adéquation via des changements environnementaux (cas b), des modifications génétiques adaptatives de l'espèce introduite (cas c) ou un mélange des deux (cas d). Différents cas empiriques soutiennent ces scénarios (Facon *et al.* 2006).

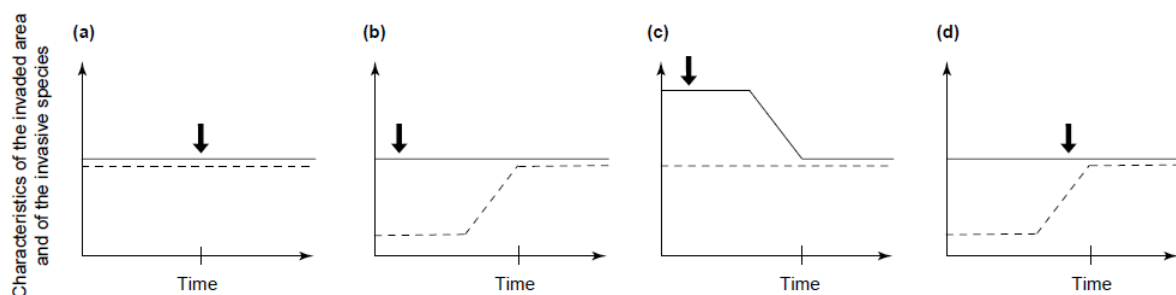


Figure 1.6. Scénarios théoriques conduisant à une invasion biologique, en fonction des caractéristiques environnementales de la région d'introduction (ligne en pointillés) et de l'espèce (ligne continue). Ces caractéristiques sont en adéquation quand les lignes sont superposées. L'introduction initiale a lieu au temps indiqué par la flèche, temps à partir duquel l'expansion (l'invasion) peut démarrer. L'invasion n'a lieu que s'il y a adéquation entre les caractéristiques environnementales et les propriétés intrinsèques de l'espèce non-indigène. En cas de non adéquation (situation b, c et d), des changements des caractéristiques environnementales ou de l'espèce non-indigène doivent avoir lieu pour permettre leur adéquation et l'invasion. Figure tirée Facon *et al.* (2006)

Encadré 1. Facteurs proposés pour expliquer le paradoxe de l'invasion
(illustrés par des exemples d'espèces marines non-indigènes)

- Les **modalités de reproduction** telles que la **reproduction asexuée** (clonalité, parthénogénèse) ou **sexuée par autofécondation** peuvent conférer un avantage lors de l'installation locale (accroissement de la densité locale) ainsi que pour la propagation de l'espèce non-indigène (un individu unique peut coloniser un nouvel habitat; Sakai *et al.* 2001). L'introduction récente de l'ascidie solitaire hermaphrodite *Corella eumyota*, au début des années 2000 sur les côtes de la Manche, est un exemple d'introduction certainement facilitée par le système de reproduction autogame de cette espèce (Dupont *et al.* 2007).
- Les **stratégies démographiques** et des capacités de **dispersions importantes** peuvent, à travers une forte fécondité et/ou une longue phase dispersive, maximiser les chances de coloniser de nouveaux habitats favorables (Lodge 1993). *Crepidula fornicata*, mollusque invasif en Manche est un cas illustrant ces stratégies : une forte production de descendants (10 à 20 000 larves par femelle (Pechenik & Lima 1984), et une longue durée de vie larvaire de 2 à 7 semaines (Rigal 2009)) permettent d'accroître localement la densité des populations et de maximiser la probabilité d'installation dans de nouveaux habitats.
- L'**absence de prédateurs ou de pathogènes** (i.e. « *enemy release hypothesis* », (Keane & Crawley 2002)) dans le nouvel environnement est un atout par rapport aux espèces indigènes. C'est par exemple le cas de l'ascidie coloniale non-indigène *Botrylloides violaceus* en Atlantique Nord : son expansion rapide a été attribuée à une large préférence du prédateur local, un échinoderme du genre *Strongylocentrotus*, pour l'ascidie coloniale indigène *Aplidium glabrum* en comparaison de son congénère introduit (Simoncini & Miller 2007).
- La **ségrégation de niches écologiques*** entre espèces peut également influencer l'établissement de l'espèce introduite dans des communautés d'espèces indigènes (Adler *et al.* 2007; Levine & HilleRisLambers 2009). Guo *et al.* (2012) ont montré une différence spatiale et temporelle d'habitat chez deux espèces proches de gobies introduits dans le lac d'Erhai en Chine, se traduisant par une absence de compétition qui expliquerait le maintien d'une forte abondance des deux espèces au sein de l'écosystème.
- La **plasticité phénotypique*** a été souvent décrite comme un mécanisme facilitant l'introduction chez les plantes terrestres (Davidson *et al.* 2011; Richards *et al.* 2006). Elle peut en effet permettre l'installation et le développement de l'espèce non-indigène dans des habitats aux conditions environnementales très contrastées. Par exemple, chez l'algue brune invasive *Sargassum muticum*, Baer & Stengel (2010) ont mis en évidence de fortes différences morphologiques et développementales, qui seraient liées à de la plasticité phénotypique entre des populations de milieux exposés aux vagues et de milieux protégés.
- L'**histoire de l'introduction** de l'espèce non-indigène joue un rôle fondamental à travers deux paramètres : la pression en propagules* (Figure E1; Lockwood *et al.* 2005) et l'origine des individus introduits. Des études théoriques et empiriques (Blackburn *et al.* 2015; Chan *et al.* 2015; et pour une revue Simberloff (2009)) ont montré qu'une forte pression en propagules augmente significativement le succès d'installation d'une espèce en réduisant les effets liés à la stochasticité démographique. La forte pression en propagules, associée à la répétition des événements d'introduction depuis des sources différentes permet en outre d'augmenter la diversité génétique des populations introduites (Figure E1), et ainsi la probabilité d'introduire des individus adaptés aux conditions environnementales rencontrées dans la région d'introduction (voir texte principal et référence aux travaux de Facon *et al.* (2006)) et la diversité génétique adaptative sur laquelle des processus de sélection pourraient opérer (Barrett & Schluter 2008; Rius *et al.* 2015).

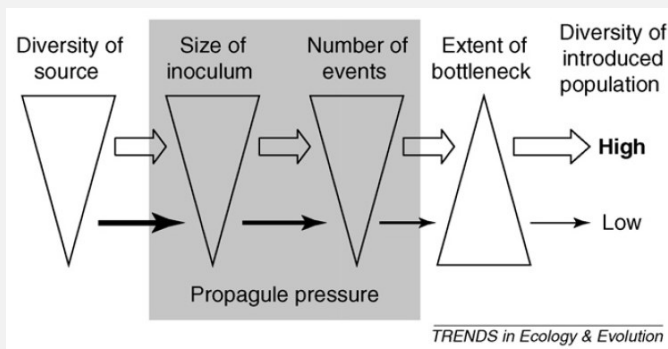


Figure E1. **Facteurs contribuant à l'augmentation de la diversité génétique dans les populations d'espèces introduites** (source : Roman & Darling (2007)). Les triangles indiquent l'importance de chaque facteur. La largeur des flèches indique l'effet de chaque facteur sur le niveau de diversité génétique conservée par rapport à la source.

2.3. Les introductions biologiques en milieu marin

Les processus d'introductions biologiques concernent l'ensemble des milieux et ont débuté depuis que l'homme parcourt les océans. Mais depuis la fin du 19^{ème} siècle, une accélération considérable du nombre d'espèces introduites a été documentée en milieu marin. Par exemple, durant le dernier siècle, leur nombre a été multiplié par 10 en Atlantique Nord-Est et presque par 20 en mer Méditerranée (DAISIE Handbook of European Alien Species-Springer, 2006). Cette augmentation est en grande partie due à la synergie entre l'accroissement des activités humaines à l'échelle mondiale et aux vecteurs d'introduction d'espèces marines non-indigènes (Hewitt *et al.* 2004).

L'aquaculture et le trafic maritime (tel que la navigation commerciale hauturière et côtière ou la navigation de plaisance) sont responsables de la majorité des introductions biologiques en milieu marin (Encadré 2). La part relative des différents vecteurs varie cependant d'une région à l'autre, par exemple le trafic maritime et l'aquaculture sont les deux vecteurs d'introduction majoritaires en Atlantique Nord Est, tandis qu'en mer Méditerranée l'aquaculture et l'ouverture du canal de Suez à la fin du 19^e siècle, responsable des migrations dites lessepsiennes, ont largement contribué à l'augmentation du nombre d'espèce introduite ces 100 dernières années (Encadré 2; Nunes *et al.* 2014). Ces différents vecteurs sont très difficiles à contrôler ainsi que les introductions qui en découlent, et ce malgré un accroissement de mesures et réglementations dans les deux dernières décennies (e.g. Convention sur les Eaux de Ballast (BWM), Règlement européen sur l'aquaculture d'espèces non-indigènes etc.).

L'histoire ancienne des introductions associée à cette multiplicité de vecteurs d'introductions explique 1) le caractère « cosmopolite » de nombreuses espèces introduites en milieu marin ainsi que 2) la difficulté de déterminer avec certitude l'aire de distribution naturelle de beaucoup d'entre elles, ce que Carlton (2009) a défini sous le terme d'espèces cryptogéniques*. C'est par exemple le cas des ascidies *Molgula manhattensis* (Haydar *et al.* 2011) et *Diplosoma listerianum* (Perez-Portela *et al.* 2013) ou encore de l'algue *Asparagopsis taxiformis* (Dijoux *et al.* 2014), toutes trois largement distribuées et reconnues comme introduites dans certaines régions mais cryptogéniques dans d'autres. Il est probable que cette multiplicité de vecteurs d'introductions ait été à l'origine de l'introduction initiale (catégories B1-B3 de la Figure 1.5) d'un très grand nombre d'espèces. Cependant, le nombre d'espèces franchissant les différents filtres et barrières est beaucoup plus restreint (Williamson & Fitter 1996). Il est difficile de quantifier le nombre d'espèces non-indigènes en milieu marin car les chiffres évoluent rapidement et le statut des espèces change (e.g. une espèce « installée » peut disparaître). Le dernier dénombrement réalisé dans le cadre du programme DAISIE faisait état de 987 espèces marines introduites à l'échelle européenne dont plus de 500 présentes en Méditerranée. D'autres études avancent à présent le chiffre de 986 espèces pour la seule mer Méditerranée (Zenetos *et al.* 2012). Par ailleurs, ces nombres sont très certainement sous estimés car :

- (1) la majorité des études sur les espèces introduites portent sur les macro-organismes (excluant les micro-organismes notamment présents dans le plancton) ;
- (2) la détection des espèces introduites demande une excellente expertise taxonomique, qui est en décroissance, et des moyens logistiques importants pour réaliser des observations de terrain ;
- (3) la détection est d'autant plus difficile lorsque les espèces introduites présentent les mêmes traits phénotypiques que des espèces natives (*i.e.* espèces cryptiques*), des cas nécessitant souvent l'utilisation d'outils moléculaires (« barcoding ») pour détecter ces introductions cryptiques (pour une revue, voir Comtet *et al.* (2015)). L'utilisation de ces outils moléculaires s'avère également importante pour valider ou invalider des identifications dans des groupes complexes et/ou pour des espèces proches (sans être au sens strict cryptiques) d'espèces indigènes. Une identification robuste et précoce est d'autant plus cruciale lors d'expansions rapides. Par exemple, une étude moléculaire a

permis non seulement de valider l'identification de l'espèce non-indigène *Asterocarpa humilis* (originaire du Pacifique Sud) mais également de documenter son expansion rapide le long des côtes anglaises lors de deux suivis menés à 3 ans d'intervalle (Bishop *et al.* 2013).

Encadré 2 : Les vecteurs d'introductions en milieu marin

Les vecteurs d'introduction en milieu marin sont multiples : 14 ont été répertoriés par Carlton (2001) à l'échelle mondiale. Néanmoins, le trafic maritime et l'aquaculture sont les deux vecteurs principaux à l'échelle mondiale : ils sont estimés respectivement responsables de 69% et 41% des introductions dans une méta-analyse réalisées, sur un échantillon de 329 espèces, par Molnar *et al.* (2008) (Figure I.7). Il existe néanmoins d'importantes disparités régionales comme on peut le voir avec les résultats de la méta-analyse réalisée par Nunes *et al.* (2014), à l'échelle européenne (Figure E2)

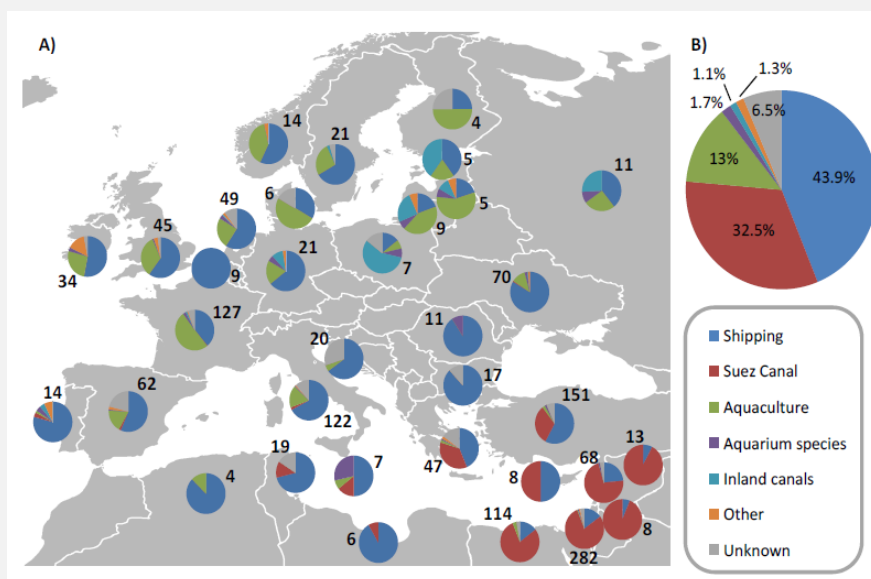


Figure E2. Proportion des différents vecteurs d'espèces introduites (pour leur première introduction) par pays receveur. Le nombre d'espèces est indiqué par la valeur indiquée à côté de chaque camembert. Figure tirée de Nunes *et al.* (2014).

- Le trafic maritime est responsable d'introductions accidentelles par le biais des eaux de ballast et du fouling. Ce vecteur, sur des parcours trans-océaniques, permet la dispersion à grande échelle d'organismes unicellulaires et pluricellulaires planctoniques (voir pour une revue, Bailey (2015)). Jusqu'à 10^4 individus (invertébrés dont les larves du mollusque *Mya arenaria*) par mètre cube ont été comptabilisés par Briski *et al.* (2012) illustrant l'importance de ce vecteur. Une diversité d'organismes est également transportée par fouling (i.e. fixation des stades adultes sur la surface de structures immergées tel que les coques des navires) : en Europe, c'est par exemple le cas de l'ascidie *Styela clava*, indigène du Pacifique Nord-Ouest, qui a été introduite en Angleterre dans les années 1950 avec des bateaux participant à la guerre de Corée (références dans Dupont *et al.* (2010)). A l'échelle régionale, le fouling sur les bateaux de plaisance ou les ferry joue également un rôle crucial, en particulier pendant la phase d'expansion d'espèces introduites (Murray *et al.* 2011).

- L'aquaculture est responsable d'introductions délibérées lorsque l'espèce est introduite pour être cultivée. C'est notamment le cas de l'huître creuse *Crassostrea gigas* introduite depuis le Japon et la Colombie Britannique (une zone ayant agit comme un relai d'introduction) pour palier la mortalité importante de l'huître plate *Ostrea edulis* dans les bassins ostréicoles européens, ou encore de la palourde *Ruditapes philippinarum* indigène de la zone Indo-Pacifique, introduite dans la lagune de Venise pour des raisons similaires (Pranovi *et al.* 2006). L'aquaculture est également vectrice d'introductions accidentelles par des espèces « accompagnatrices » (par exemple des epibiontes sur des coquilles d'huîtres). C'est le cas supposé d'environ 60 espèces d'algues originaires du Japon (*Sargassum muticum*, *Undaria pinnatifida*, *Grateloupia turuturu*, etc.) introduites accidentellement lors de l'importation de l'huître creuse dans l'Etang de Thau entre les années 1970 et 1980 (Mineur *et al.* 2007).

De ces intenses échanges commerciaux existants au niveau planétaire (par voie maritime et échanges aquacoles), il n'est pas surprenant que la présence d'espèces introduites ait été répertoriée dans 84% des écorégions marines (Molnar *et al.* 2008). On note cependant certains « points chauds » d'introduction tels que la mer Méditerranée, l'Atlantique Nord-Est, l'archipel d'Hawaï et le Pacifique Nord-Est (Figure I.7).

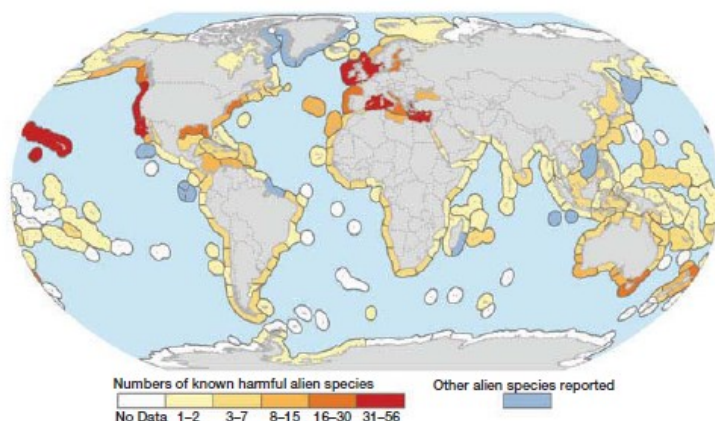


Figure I.7. **Carte de distribution des espèces introduites « nuisibles »** (i.e. ayant un impact sur l'écosystème ou les communautés), soit 57% des 329 espèces étudiées par Molnar *et al.* (2008) **parmi les 232 écorégions marines réparties à l'échelle mondiale.** Figure issue de Molnar *et al.* (2008).

Même si ce différentiel d'introduction peut s'expliquer par des pressions d'observation variables entre les régions, il reflète également des corridors d'invasions, par exemple depuis l'Asie via l'importation d'huître creuse *Crassostrea gigas* vers les côtes du Nord-Est du Pacifique ou vers l'Europe. L'intensité des échanges, le nombre de vecteurs et le contrôle difficile des introductions en milieu marin sont très probablement à l'origine d'une importante pression en propagules* (Encadré 1) et d'introductions répétées au cours du temps d'une même espèce. Les analyses génétiques d'espèces introduites vont dans le sens de cette hypothèse (Roman & Darling 2007; Geller *et al.* 2010; Rius *et al.* 2015). Par exemple, pour les introductions en Europe, et sur la base de 87 études concernant 59 espèces de différents groupes taxonomiques (e.g. macrophytes, poissons, crustacés, ascidies etc.) et présentant des traits d'histoire de vie* variés (e.g. espèces à développement direct ou présentant une phase larvaire), Rius *et al.* (2015) montrent que dans 76% des cas, la diversité génétique des populations introduites est égale voire supérieure à celle observée en moyenne dans les populations situées dans l'aire de distribution naturelle de l'espèce. Le cas de du gastéropode *Crepidula fornicata* illustre bien cette grande diversité génétique trouvée dans les populations d'espèces marines introduites (Figure I.8).

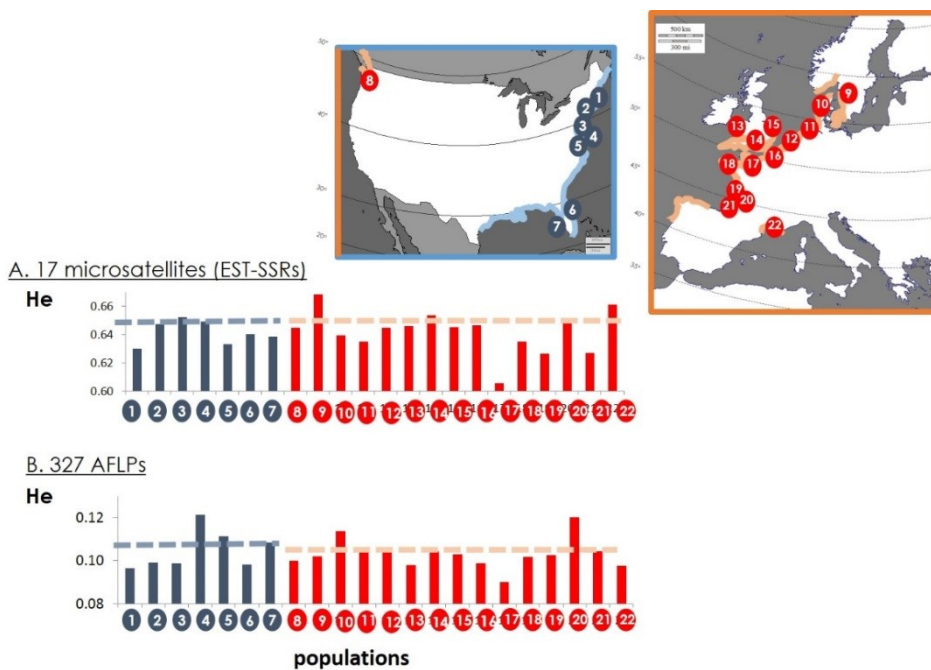


Figure 1.8. **Diversité génétique** (estimée par l'indice H_e avec un jeu de 17 locus microsatellites et 327 marqueurs AFLP) **au sein de populations de l'aire de distribution naturelle (barres bleues) et de l'aire d'introduction (barres rouges) du gastéropode *Crepidula fornicata*** montrant l'absence de perte de diversité génétique entre les deux types d'aire. Le trait pointillé indique la diversité moyenne au sein des deux types d'aire, qui sont représentées respectivement en bleu et en rouge dans les cartes en haut à droite. Figure issue de Riquet et al. (2013).

L'observation d'une diversité génétique accrue dans les populations de l'aire d'introduction d'une espèce peut sembler à première vue surprenante mais elle reflète généralement des mélanges locaux d'individus issus de plusieurs populations sources génétiquement différentes entre elles. Par ailleurs, si ces différents groupes d'individus se croisent entre eux, ce qui est très probable au sein d'une même espèce (mais voir le cas de l'ascidie *Microcosmus squamiger* pour un contre-exemple surprenant; Ordóñez et al. 2013), des profils dits d'« admixture » peuvent être révélés. C'est d'ailleurs un des mécanismes évolutifs par lequel la pression en propagules et la diversité des sources pourraient être mises en lien avec le succès d'introduction (Rius & Darling 2014; Rius et al. 2015). Un cas extrême de mélanges entre des groupes génétiquement différenciés est celui de l'introduction d'une espèce non isolée reproductivement avec une espèce indigène ou avec une autre espèce introduite. Dans ce dernier cas, des processus d'hybridation peuvent avoir lieu, avec de multiples conséquences aussi bien écologiques qu'évolutives.

III. Les conséquences écologiques et évolutives des contacts secondaires lors d'introductions biologiques

3.1. Chevauchement des niches écologiques et interactions compétitives

A la suite de la mise en contact dans une même région de deux espèces qui étaient auparavant en allopatrie, et lorsque les deux espèces dépendent des mêmes ressources ou utilisent les mêmes habitats, c'est-à-dire ont des niches écologiques* chevauchantes voire identiques, on peut s'attendre à des interactions compétitives entre elles.

Lors d'introductions biologiques, ces interactions compétitives peuvent agir rapidement sur la distribution de l'espèce indigène comme sur celle de l'espèce non-indigène dans l'environnement nouvellement colonisé. Les processus de compétition entre espèces peuvent être à l'origine 1) de déplacements de la niche écologique des deux espèces avec des modifications de l'habitat ou des ressources trophiques (i.e. ségrégation de niche; Nilsson 1967), 2) d'une diminution de la densité des individus voire de l'extinction d'une des deux espèces dans la niche écologique (i.e. exclusion compétitive; Hardin 1960), ou encore 3) de la réduction de la croissance des individus de l'une des deux espèces due à une compétition asymétrique pour la ressource trophique lorsque cette dernière est insuffisante dans le milieu environnant (Bohn & Amundsen 2001).

Plusieurs exemples en milieu aquatique illustrent ces différents cas de compétition entre espèces indigènes et non-indigènes (Rius *et al.* 2009), y compris au sein d'un même genre (Franke *et al.* 2007). Ainsi, les interactions trophiques entre le lavaret *Coregonus lavaretus* et le corégone blanc *C. albula* est l'un des rares exemples d'exclusion compétitive entre deux espèces occupant la même niche écologique, à la suite de l'introduction locale de ce dernier dans plusieurs cours d'eau de Finlande (Bohn *et al.* 2008). Le lavaret, indigène des cours d'eau finlandais est présent sous la forme de deux morphotypes l'un inféodé à la zone pélagique des cours d'eau et l'autre à la zone benthique (différenciation actuellement expliquée par une divergence écologique entre ces deux morphotypes (Ostbye *et al.* 2006)). Depuis l'introduction du corégone blanc à la fin des années 1980, la part du lavaret (morphé pélagique) a largement diminué dans les communautés de poissons pélagiques ; le corégone blanc, plus compétitif dans le réseau trophique, a ainsi supplanté l'espèce indigène et cela dès le début du processus d'introduction (Figure I.9). Jusqu'à 90% de la population de lavaret (morphé pélagique) aurait ainsi disparu en l'espace de 14 ans au contraire de son congénère benthique qui, ne partageant pas la même ressource trophique que le corégone blanc, n'a pas été impacté par son introduction (Bohn *et al.* 2008).

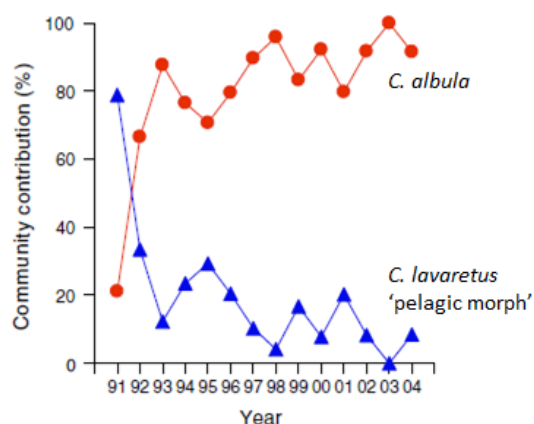


Figure I.9. Contribution annuelle de l'espèce locale *Coregonus lavaretus* (morphé pélagique) et de l'espèce introduite *C. albula* dans les communautés de poissons pélagiques d'un cours d'eau situé en Finlande (Pasvik), deux années après l'introduction de ce dernier. Cette proportion est calculée sur la base du nombre de poissons prélevés par une méthode de capture par unité d'effort. Figure modifiée de Bohn *et al.* (2008).

Même si différentes études semblent indiquer que les espèces non-indigènes voient souvent leur niche conservée dans la région d'introduction (notion appelée « stabilité de niche »), il existe également des évolutions possibles postérieurement à l'introduction (Guisan *et al.* 2014).

Des expansions, réductions ou déplacements de niche peuvent se produire, notamment en réponse à une pression environnementale ou de compétition exercée par une espèce indigène proche ou par un prédateur (voir Table S1 de Guisan *et al.* (2014)). La non-stabilité de la niche de l'espèce non-indigène est d'ailleurs un sujet de recherche important notamment en regard des modèles de distribution d'habitats d'espèces introduites, utilisés notamment pour définir les futurs risques d'invasions (Parravicini *et al.* 2015). L'histoire éco-évolutive passée des deux espèces a une importante influence sur l'issue de ces interactions compétitives, notamment quand les deux espèces partagent des traits fonctionnels et des traits d'histoire de vie commun.

3.2. Flux de gènes interspécifiques entre espèces non isolées reproductivement

Comme dans le cas des interactions compétitives entre espèces, les conséquences évolutives de contacts secondaires anthropiques entre espèces proches auparavant en allopatrie sont multiples (Fitzpatrick *et al.* 2012). Elles dépendent notamment de l'importance des barrières aux flux de gènes qui ont évolué au cours du processus de spéciation entre les deux espèces (Encadré 3). Tout en décrivant brièvement ces conséquences, j'en donnerai quelques exemples dans le cadre de processus d'introduction biologique :

3.2.1. Formation d'une zone hybride. L'existence d'un isolement post-zygotique partiel entre deux espèces peut se traduire par la formation d'une « zone hybride », c'est-à-dire une zone géographique étroite, dans et autour de la zone de contact, où se produit l'hybridation alors que de part et d'autre les populations parentales sont maintenues (Barton & Hewitt 1985). Dans le cas des introductions biologiques, les populations de l'espèce indigène isolées ou distantes de la zone d'introduction et non impactées par l'hybridation peuvent servir de « réservoirs » pour alimenter la zone hybride en allèles indigènes ce qui peut ralentir la propagation de l'espèce non-indigène dans la zone d'introduction. C'est par exemple le cas de la phalène brumeuse *Operophtera brumata*, introduite en Amérique Nord-Est, pour laquelle l'arrivée constante de migrants de l'espèce indigène *O. bruceata* couplée à un isolement reproducteur partiel, a ralenti sa propagation dans la zone d'introduction en l'espace de 3 ans (Elkinton *et al.* 2014).

3.2.2. Extinction par introgression. Dans le cas où l'isolement reproducteur entre espèces est très faible voire inexistant, les populations parentales se reproduisant aléatoirement ainsi que leurs descendants engendrent un grand nombre d'individus hybrides et introgressés (*i.e.* « *hybrid swarm* »; Allendorf *et al.* 2001). Dans le contexte des processus d'introduction d'espèce, l'extinction des populations de l'espèce indigène par hybridation et introgression répétée avec une espèce non-indigène est aussi une autre conséquence possible (Rhymer & Simberloff 1996). C'est par exemple le scénario proposé entre la truite fardée (indigène) et la truite arc-en-ciel (non-indigène), deux espèces interfertiles présentes dans plusieurs rivières du Nord-Ouest de l'Amérique. En l'espace de 30 ans, la proportion d'allèles de la truite arc-en-ciel dans les populations de la truite fardée est passée de 10 à 52% (Figure I.10) en remontant en amont de la rivière étudiée (Muhlfeld *et al.* 2014). L'augmentation d'individus hybrides a été largement accélérée par des modifications de paramètres environnementaux liés au changement global (*i.e.* augmentation de la température des cours d'eau, Figure I.10 ; diminution des précipitations) en plus de l'arrivée de nouveaux migrants. Le scénario le plus probable à terme est une extinction par introgression de la truite fardée due à la propagation massive des allèles de l'espèce non-indigène dans les populations « réservoirs » de l'espèce indigène situées en amont de la rivière.

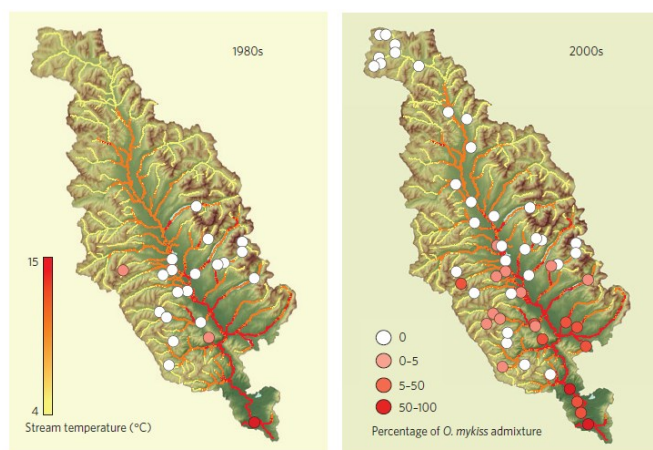


Figure 1.10. **Propagation spatio-temporelle des allèles de la truite arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*), par hybridation et introgression, dans les populations de la truite fardée (*O. clarkii lewisi*) entre les années 1980 et 2000.** Ici la propagation des allèles de l'espèce non-indigène est mise en relation avec l'augmentation de la température des cours d'eau ces 30 dernières années. Figure tirée de Muhlfeld *et al.* (2014).

3.2.3. Emergence de nouvelles espèces. Les espèces en contact peuvent via leur croisement aboutir à la formation d'une espèce hybride. Cela a notamment été largement mis en évidence chez les plantes terrestres et mis en relation avec l'introduction d'espèces par l'homme (Guo 2014). C'est par exemple le cas de deux espèces de radis sauvage du genre *Raphanus* (*R. raphanistrum* et *R. sativus*), toutes deux introduites à la fin du 19^e siècle en Californie. Les flux de gènes continus et la recombinaison entre les génomes de ces deux espèces ont abouti à l'émergence d'une nouvelle espèce appelée le radis sauvage Californien génétiquement et morphologiquement intermédiaire entre les deux espèces parentales (Hegde *et al.* 2006). Par ailleurs, des travaux récents ont montré que l'espèce hybride est plus compétitive en termes de colonisation de l'habitat : elle montre une plus forte production et une meilleure protection des graines produites que celles observées chez les deux espèces parentales (Hovick *et al.* 2012; Heredia & Ellstrand 2014). Cette forte compétitivité pourrait à long terme aboutir au remplacement des espèces parentales par l'espèce hybride (Hegde *et al.* 2006). On voit ici un exemple très clair de l'interaction entre processus écologiques et évolutifs consécutifs à un contact secondaire lors d'une introduction. Il est important de noter que de nouvelles espèces peuvent également apparaître par le biais de modifications chromosomiques, notamment des mécanismes de polyploïdisation, très communément observés chez les plantes terrestres (pour une revue, voir Schierenbeck & Ellstrand (2009)). La spartine anglaise *Spartina anglica*, espèce allopolyploïde issu du doublement chromosomique de l'hybride stérile *S. x townsendii*, lui-même issu du croisement entre *S. maritima* et *S. alterniflora* (respectivement indigène et non-indigène en Europe) en est l'un des cas les plus emblématiques (voir Salmon *et al.* (2005) pour une revue de l'hybridation et des processus de polyploïdisation au sein du genre *Spartina*).

3.2.4. Hybridation sans introgression et processus de renforcement. Ce cas est défini par des espèces en contact quasiment isolées reproductivement mais qui peuvent toutefois engendrer des individus hybrides-F1 dont la valeur sélective* sera diminuée (*i.e.* non-viabilité ou stérilité des hybrides-F1). Une très faible proportion voire aucun individu hybride F2 ou backcross n'est alors produit. C'est par exemple le cas entre la truite-bœuf *Salvelinus confluentus* et la truite mouchetée *S. fontinalis*, respectivement indigène et non-indigène des bassins d'eau douce de l'Amérique du Nord, où une très faible proportion d'individus issus de croisements récents (F2, backcross) sont observés en milieu naturel, malgré la production d'un grand nombre d'hybrides F1 (DeHaan *et al.* 2010). Ce processus de contre-sélection des hybrides et de leurs descendants peut entraîner un renforcement de l'isolement reproductif entre les lignées parentales (*i.e.* spéciation par renforcement) par la mise en place de mécanismes d'isolement pré-zygotique diminuant le fardeau d'hybridation (généralement observé sur des caractères sexuels, voir pour revue Servedio & Noor (2003)).

Encadré 3. Isolement reproductif et spéciation : un bref aperçu sur ces processus (et une terminologie) complexes

Dans sa définition la plus simple, la spéciation est définie comme un processus évolutif durant lequel des populations séparées, par des barrières géographiques ou écologiques, accumulent des barrières reproductives jusqu'à devenir complètement isolées reproductivement (Coyne & Orr 2004).

Il existe de multiples mécanismes participant à l'évolution ou au maintien de cet isolement reproductif (Figure E3.1). Dans la littérature, ces **mécanismes d'isolement reproductif ou barrières reproductives** sont communément **classés selon leur intervention dans le cycle de vie**: avant la fécondation (isolement pré-zygotique) ou après la fécondation (isolement post-zygotique); et **selon leur dépendance ou non à l'environnement**: dépendant des propriétés intrinsèques des espèces qui agissent contre les hybrides (endogène) ou des propriétés du milieu environnant qui favorisent l'une ou

l'autre des espèces dans des habitats différentiels (exogène). Ces mécanismes d'isolement ont fait l'objet de nombreuses études empiriques par des approches expérimentales et génétiques (Barton & Hewitt 1985; Schluter 2001).

Le plus souvent, plusieurs de ces mécanismes contribuent à l'isolement reproducteur, par exemple :

- l'accouplement préférentiel et la stérilité des hybrides contribuent à l'isolement reproductif entre les deux sous-espèces de souris *Mus musculus musculus* et *M. musculus domesticus* (Smadja et al. 2004; Britton-Davidian et al. 2005)
- la sélection dans l'habitat, la contre-sélection des hybrides et l'accouplement préférentiel chez deux espèces de criquet du genre *Gryllus* (Larson et al. 2013; Larson et al. 2014)
- ou encore, pour un exemple en milieu marin, une combinaison de ces mécanismes dans la zone hybride des taxons *Mytilus edulis* et *M. galloprovincialis* en Europe (sélection dans l'habitat (Gardner 1994; Bierne et al. 2003); fécondation préférentielle (Bierne et al. 2002); contre-sélection des hybrides (Bierne et al. 2006)).

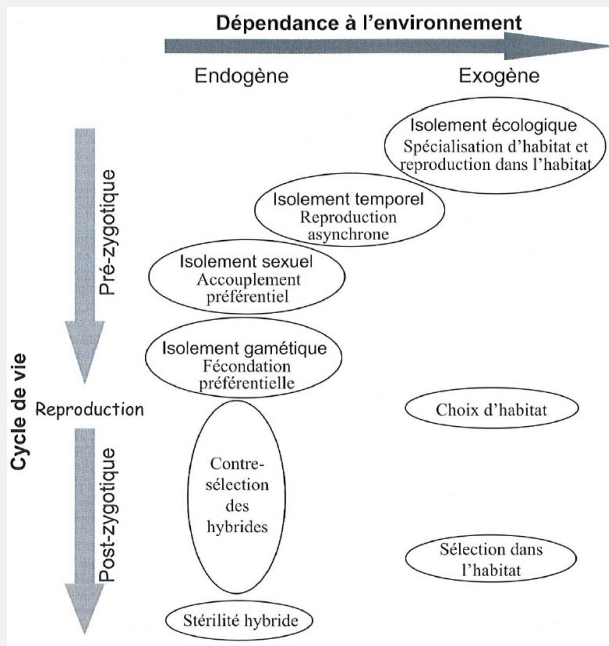


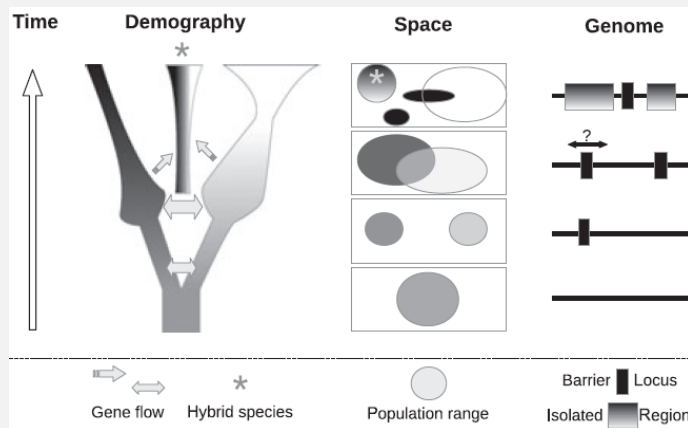
Figure E3.1. **Typologie des différents mécanismes d'isolement reproductif** en fonction de leur dépendance à l'environnement et de leur intervention au cours du cycle de vie. Figure tirée de Ravigné et al. (2010)

Trois modes de spéciation ont été historiquement distingués :

- La spéciation **avec absence complète de flux de gènes (i.e. allopatrique)** via des barrières physiques (par exemple, un isthme) entre deux populations. Les effets de la dérive génétique ou de pressions de sélections différentielles créent de la divergence génétique et de l'isolement reproducteur entre les deux populations.
- La spéciation **avec absence partielle de flux de gènes (i.e. parapatric)** facilitée par l'hétérogénéité de pressions de sélection entre des populations discrètes ou par un gradient environnemental le long duquel les populations les plus éloignées divergent entre elles. Ce mode de spéciation est possible dans le cas de flux de gènes limités et d'une contre sélection des migrants ou des hybrides (Bank et al. 2012).
- La spéciation **avec absence de barrières aux flux de gènes (i.e. sympatric)** théoriquement liée à une sélection différentielle entre deux populations dans un environnement présentant des contraintes biotiques et abiotiques hétérogènes (Kirkpatrick & Ravigne 2002).

Actuellement, la vision du processus de spéciation est beaucoup moins catégorielle et reflète un processus plus graduel dans le temps et l'espace et sur plusieurs niveaux (voir pour revue Abbott et al. (2013); Figure E3.2). Au cours du temps, les populations sont soumises à une variété de processus démographiques et migratoires entraînant des alternances entre des périodes d'isolement (sans flux de gènes) et des périodes où des flux de gènes sont possibles entre populations. Ces processus laissent une empreinte sur l'architecture des génomes. Des « locus barrières » apparaissent pendant les périodes d'isolement en allopatrie et contribuent à la réduction des flux de gènes entre certaines portions génomes. Au cours du temps, ces zones s'accumulent jusqu'à l'émergence de régions du

génomme particulièrement divergentes puis de génomes entre lesquels il n'y aura plus de flux de gènes. D'une façon générale, les processus d'hybridation vont laisser des traces sur le génome et son architecture, qui va le plus souvent être qualifié de « génome mosaïque », avec des régions différenciellement introgressées entre les deux taxons (Harrison & Larson 2014).



Reflétant la complexité des mécanismes et typologie en lien avec les processus de spéciation et d'isolement reproductif, il existe une variété de définitions et de terminologie (Tableau E1).

Tableau E1. Liste des termes scientifiques anglais utilisés pour décrire les processus de spéciation et phénomènes associés (issu de Harrison (2012)). Comme prévient l'auteur, ce tableau ne vise pas à être un résumé complet du langage scientifique utilisé dans l'étude de la spéciation mais une base de discussion. Le tableau est organisé en fonction du sujet, avec pour chaque terme une liste des termes équivalents ou associés

	Term	Equivalent/overlapping terms	Related terms, specific examples
Geography	allopatric speciation	geographic speciation, $m=0$	peripatric, centrifugal, founder effect
	parapatric speciation	semi-geographic speciation, $0 < m < 0.5$, divergence with gene flow	divergence along environmental gradients
	sympatric speciation	$m=0.5$, divergence with gene flow	mosaic sympatry, hybrid speciation
Gene Flow	potential gene flow	dispersal, migration	
	realized gene flow	effective gene flow, introgression	
	barriers to gene flow		physiological/geographic, intrinsic/extrinsic
	intrinsic barriers	reproductive isolation, isolating mechanisms	pre-mating, post-mating and pre-zygotic, post-zygotic
	post-zygotic barriers	reduced viability or fertility	environment-dependent or -independent
	ecological isolation	potential mates do not meet	temporal isolation, habitat/resource isolation
Genetics	habitat isolation	differential adaptation, habitat preference	ecogeographic isolation, immigrant inviability, isolation by adaptation
	genetic architecture	number, distribution, effect size of genes	speciation gene, barrier gene
	genic view	gene as unit of evolution	genealogical discordance, F_{ST} outlier, differential introgression, semi-permeable species boundary
	islands of speciation	genomic islands of divergence, genetic mosaic, mosaic genome, heterogeneous genome divergence	divergence hitchhiking
Hybridization	hybrid	individual of mixed ancestry	F_1 hybrid, backcross
	hybrid zone	secondary contact, primary intergradation	mosaic hybrid zone
	hybrid speciation	mosaic genome speciation, hybrid trait speciation	allopolyploidy, homoploid recombinational speciation, introgressive hybridization

Dans ce manuscrit, j'utiliserai la terminologie suivante :

- « **hybridation** » qualifiera les flux de gènes issus de croisements entre deux espèces sur les premières générations (F_1 , F_2 , backcross)
- « **introgression** » qualifiera les flux de gènes interspécifiques à l'origine de l'incorporation d'allèles d'une espèce vers le pool génétique d'une autre espèce via des croisements sur plusieurs générations.
- « **flux de gènes interspécifiques** » englobera les précédentes définitions.
- « **hybride- F_1** » qualifiera les individus hybrides de 1^{ère} génération (i.e. hétérozygote à tous les locus)
- « **hybride** » qualifiera les individus issus de l'hybridation (F_1 , F_2 et backcross)
- « **individus introgressés** » définira les individus présentant de l'introgression

3.2.5. Introgression adaptative. Une des conséquences possibles de l'hybridation entre deux espèces est le transfert d'allèles conférant un avantage sélectif (sur un trait phénotypique par exemple) d'une espèce vers l'autre espèce, allèles qui seront ensuite sélectionnés chez cette dernière (Abbott *et al.* 2013). Ce processus a largement été mis en évidence chez les plantes par des approches couplées de QTL (« Quantitative Trait Locus », associant le génotype et la valeur d'un trait phénotypique), de génétique et d'expériences en jardin commun (e.g. Martin *et al.* 2006; Kim *et al.* 2008; Whitney *et al.* 2010)). Plusieurs études de génomique ont récemment mis en évidence ce processus chez différents taxons d'espèces animales (pour une revue, voir Hedrick (2013)). C'est le cas du phénotype rouge des ailes (trait associé au mimétisme) sélectionné chez deux espèces de papillons tropicaux du genre *Heliconius*. Ce trait résulterait d'introgressions par une autre espèce du même genre avec laquelle elles coexistent (Dasmahapatra *et al.* 2012). Le même type de processus a été proposé pour plusieurs allèles situés dans des régions du génome impliquées dans des fonctions physiologiques ou immunitaires chez certaines populations de l'homme moderne, qui seraient issus d'introgression par des espèces éteintes du genre *Homo* (voir pour une revue, Racimo *et al.* (2015)). Dans le cadre des processus d'introduction biologique, l'introgression d'allèles avantageux de l'espèce indigène (déjà adaptée à son environnement) vers l'espèce non-indigène peut favoriser l'établissement de cette dernière dans la zone d'introduction. Actuellement sont répertoriés des cas contraires dans la littérature, c'est-à-dire la fixation rapide d'allèles non-indigènes dans le génome de l'espèce indigène (i.e. « super invasive alleles » (Hohenlohe *et al.* 2013)). De tels processus ont été par exemple mis en évidence entre la salamandre rayée et la salamandre indigène de Californie (Fitzpatrick *et al.* 2010) où trois allèles de la salamandre rayée ont montré des taux d'introgression extrêmement élevés au sein du génome de la salamandre indigène par rapport aux 65 autres marqueurs étudiés (Figure I.11) ; ou encore entre la truite fardée et la truite arc-en-ciel respectivement indigène et non-indigène des bassins d'eau douce d'Amérique du Nord (Hohenlohe *et al.* 2013).

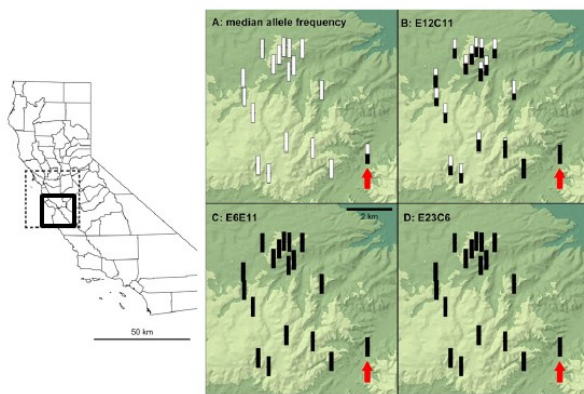


Figure I.11. **Variations de la fréquence allélique observée dans les populations de la salamandre Californienne.** Chaque barre représente une population avec la proportion d'allèles indigènes (en blanc) et non-indigènes (en noir). (A) Pour 65 marqueurs des 68 étudiés, les allèles non-indigènes sont détecté uniquement dans une population (indiqué par une flèche rouge) au contraire des 3 marqueurs restants (B-D) où les allèles non-indigènes ont rapidement été fixés (ou presque) dans toutes les populations indigènes de la zone étudiée. Figure modifiée de Fitzpatrick *et al.* (2010).

Les introductions biologiques qui contribuent à mettre en contact des espèces ayant des niches écologiques proches ou/et non isolées reproductivement sont ainsi potentiellement à l'origine d'importants changements chez les espèces indigènes et non-indigènes. Comme nous l'avons vu plus haut avec quelques exemples concernant les capacités compétitives d'hybrides entre espèces indigènes et non-indigènes, les processus écologiques et évolutifs ne jouent pas sur le devenir des deux espèces de façon indépendante.

3.3. Impact d'évènements anciens sur l'interprétation des patrons d'hybridation contemporain

Les conséquences des hybridations issues de contacts secondaires induits par les introductions biologiques devraient en théorie être relativement faciles à mettre en évidence, par exemple en

recherchant dans les populations des deux espèces des déséquilibres nucléo-cytoplasmiques ou en recherchant des individus hybrides-F1 ou issus de backcross récents avec des marqueurs génétiques diagnostiques des deux espèces. Cependant, la recherche de ces signatures génétiques et génomiques peut être compliquée en fonction de l'histoire évolutive commune aux deux espèces. On trouve d'ailleurs ici une certaine analogie avec les études cherchant à identifier des signatures d'adaptation locale (Encadré 4). Les paragraphes ci-dessous visent à illustrer certaines de ces difficultés d'interprétations des patrons d'hybridations actuels du fait d'évènements passés.

3.3.1. Polymorphisme partagé entre espèces

Plusieurs évènements évolutifs peuvent être responsables de la présence de mêmes allèles chez deux espèces. Les flux de gènes interspécifiques actuels ou passés en sont évidemment un (Figure I.12.C), mais d'autres processus peuvent mettre en évidence le même patron génétique (Figure I.12).

La **convergence moléculaire** ou l'**évolution parallèle** peut se produire si un allèle identique (A2 dans la Figure I.12.A) apparaît par mutation et augmente en fréquence chez les deux taxons en cours de divergence, jusqu'à être maintenu dans les populations contemporaines. Ce cas est relativement rare car il implique que l'allèle présente un caractère adaptatif et/ou que les deux espèces évoluent dans des conditions relativement proches (voir Wood *et al.* (2005) pour une revue).

Le **maintien d'un allèle ancestral sous l'effet du hasard ou de la sélection** peut également être responsable de polymorphisme partagé entre espèces (Figure I.12.B). Le maintien sous l'effet du hasard signifie que l'allèle ancestral n'a pas été éliminé par la dérive génétique, donc concerne essentiellement des espèces ayant récemment commencé à diverger. Cependant, la dérive génétique dépendant de la taille efficace* des populations, ce polymorphisme ancestral pourrait se maintenir relativement longtemps quand les tailles efficaces sont grandes (Maddison 1997). Il est difficile de différencier si le polymorphisme partagé observé résulte de l'un ou l'autre de ces processus, cela dépend généralement du temps écoulé depuis la divergence entre les deux espèces (plus la divergence est ancienne, plus la probabilité d'observer du polymorphisme ancestral est faible) et du nombre de marqueurs utilisés ainsi que de leur couverture génomique (plus le nombre de marqueurs génétique est élevé, plus la probabilité d'observer de tels évènements neutres est élevée).

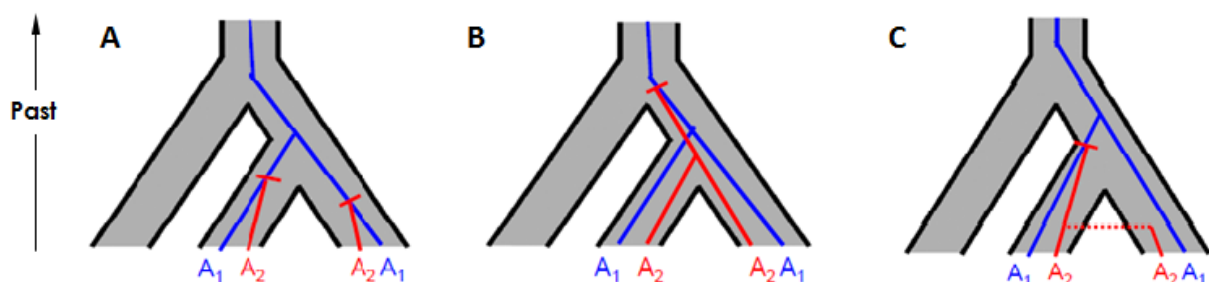


Figure I.12. **Schématisation de différentes histoires évolutives conduisant à du polymorphisme partagé entre deux taxons** (l'allèle ancestral est noté A1 et l'allèle dérivé A2). (a) l'évolution parallèle ou la convergence moléculaire, (b) le maintien de polymorphisme ancestral sous l'effet du hasard ou par sélection et (c) les flux de gènes interspécifiques. Figure modifiée de Hedrick (2013).

3.3.2. Les contacts secondaires anciens laissent aussi des traces...

Comme décrit précédemment, les aires de distribution d'espèces sont dynamiques sur des longues échelles de temps. De ce fait, des taxons en cours de spéciation peuvent être remis en contact au gré des modifications de leurs aires de distribution (Voir Figure E3.2, Encadré 3). En

absence d'isolement reproductif, ces taxons peuvent s'hybrider. Des gènes peuvent être introgressés de façon symétrique ou asymétrique, ainsi que d'intensité différentielle (i.e. l'introgression est plus ou moins importante selon les régions du génome), dans le génome de l'un ou l'autre des deux taxons. En conséquence, du fait de cette construction d'un génome mosaïque au cours du processus de spéciation, certaines régions vont être différenciellement fixées entre les deux taxons et d'autres seront introgressées (Figure I.13).

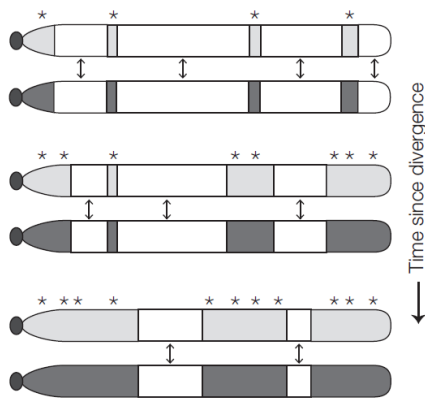


Figure I.13. Représentation de la semi perméabilité des génomes de deux espèces en cours de divergence. Chaque paire de barres horizontales représente les chromosomes de deux lignées divergentes. Les gènes contribuant à l'isolement reproductif sont indiqués par un astérisque. A la suite d'un contact secondaire, ces régions où sont situés les gènes d'isolement restent différenciées (représentées en gris clair et gris foncé) alors que les flux de gènes interspécifiques se font librement dans les autres parties du génome (en blanc) formant ainsi un génome mosaïque. Avec l'augmentation du temps de divergence entre les deux espèces, on s'attend à ce qu'un plus grand nombre de gènes contribuent à l'isolement reproductif et que les flux de gènes interspécifiques soient restreints dans le génome. Figure tirée de Harrison & Larson (2014).

Ainsi, lorsque deux espèces ont échangé des gènes par le passé lors de contacts secondaires historiques, **on s'attend à voir dans les populations actuelles l'empreinte laissée par les introgressions passées**. C'est par exemple le cas entre trois espèces du genre *Mytilus* (*M. trossulus*, *M. galloprovincialis* et *M. edulis*) dont la distribution actuelle résulte à la fois de migration naturelle ancienne et d'introductions biologiques contemporaines (Daguin 2000; Borsa *et al.* 2007). Les contacts entre ces espèces ont conduit à l'émergence de zones hybrides dans lesquelles des flux de gènes interspécifiques ont lieu malgré l'existence de mécanismes d'isolement reproductif pré- et post- zygotiques (Suchanek *et al.* 1997; Brannock *et al.* 2009; Encadré 3). Plusieurs marqueurs de type allozymiques* (Glu et mac-1) ont été classiquement utilisés pour réaliser des diagnostics génétiques des espèces *M. galloprovincialis* et *M. edulis* et de leurs hybrides dans ces zones. Cependant les génotypes obtenus dans différentes populations de ces espèces à une échelle mondiale incluant des populations allopatriques (donc sans contact contemporain) ont montré que ces marqueurs n'étaient en fait pas diagnostiques des flux de gènes actuels car localisés dans des régions du génome historiquement introgressées lors de contacts secondaires passés entre ces espèces (Borsa *et al.* 2007; Borsa *et al.* 2012). Des tests de scénarios par des approches bayésiennes à partir de données de séquences non codantes obtenus chez des individus de populations allopatriques de *M. galloprovincialis* et *M. edulis* ont mis en évidence des taux d'introgression hétérogènes entre les locus et les espèces, causés par des contacts secondaires estimés s'être déroulés entre 390,000 et 1,150,000 millions d'années (durant les oscillations glaciaires du Quaternaire; Roux *et al.* 2014).

Malgré le nombre considérable d'espèces marines transportées à l'échelle globale (voir partie II.B de cette introduction), et par conséquent le nombre important de contacts secondaires attendus, les cas d'étude de ce type de contact sont encore très rares en milieu marin. On notera cependant, les espèces de moule du genre *Mytilus* (voir partie 3.3.2 ; Saarman & Pogson 2015), les huîtres du genre *Crassostrea* en Europe (Huvet *et al.* 2002; Huvet *et al.* 2004) et les algues brunes du genre *Fucus* en Atlantique Nord-Est (Hoarau *et al.* 2015) ou encore les poissons coralliens du genre *Abudefduf* dans l'archipel d'Hawaï (Coleman *et al.* 2014). Les ascidies du genre *Ciona* sont, dans ce contexte, de très bons modèles d'étude.

Encadré 4: Adaptation locale versus barrières endogènes aux flux de gènes : un autre exemple où l'histoire évolutive des espèces compte beaucoup...

L'utilisation de méthodes dites de balayages (ou scans) génomiques* est largement utilisée pour tester des hypothèses adaptatives telles que de la sélection sur de la variation génétique existante, mettre en évidence de l'adaptation locale à des conditions environnementales particulières et donc aussi tester des scénarios de spéciation sympatrique ou écologique. Or, comme montré par Bierne *et al.* (2011), cette approche peut être biaisée par l'histoire même de l'espèce.

Le scénario d'adaptation locale est par exemple utilisé pour expliquer la grande proportion de locus sous sélection trouvés entre des populations de la Mer Baltique (caractérisée par de faibles valeurs de salinité) et la Mer du Nord chez plusieurs espèces marines (e.g. chez la morue Atlantique (Nielsen *et al.* 2009) et le bivalve *Macoma baltica* (Luttikhuisen 2012)). Une explication alternative à ces processus de sélection environnementale a été proposée par Bierne *et al.* (2011). Les oscillations glaciaires du Quaternaire ont pu piéger des populations de ces espèces (comme suggéré pour l'espèce *M. baltica*; Becquet *et al.* 2012) dans une zone refuge située dans la Mer Baltique. Du fait de la divergence entre les populations isolées des deux mers, des barrières génétiques se sont mises en place entre elles. De ce fait, on ne peut pas exclure que ces locus sous sélection (directe ou indirecte) soient associés à des locus impliqués dans des incompatibilités génétiques résultant de cette divergence ancienne. Des simulations réalisées par Bierne *et al.* (2011) montrent que le couplage entre locus barrières et locus d'adaptation locale génère des zones de tensions entre populations uniquement maintenues par les locus d'incompatibilités génétique (Figure E4), dont la géographie coïncide généralement avec des zones aux conditions biotiques ou abiotiques contrastées (e.g. gradient de salinité entre la Mer Baltique et la Mer du Nord). Ce couplage entre clines environnementaux et barrières endogènes (*i.e.* reproductives) résulte de processus évolutifs anciens mais laisse une empreinte sur les schémas génétiques actuels, comme dans le cas des introgressions anciennes par rapport aux hybridations actuelles.

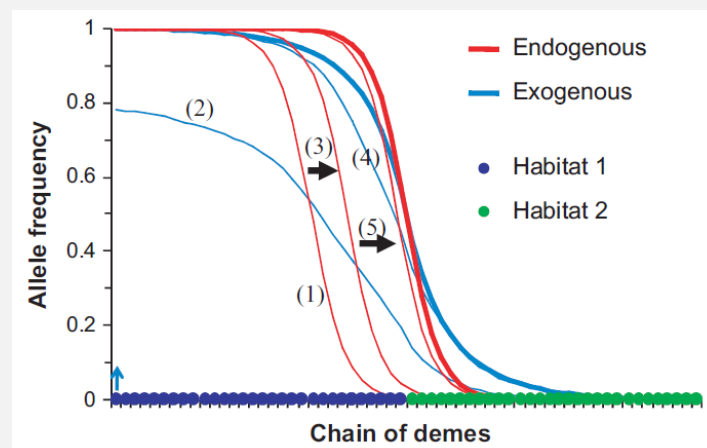


Figure E4. **Couplage entre clines exogènes** (lié à une barrière environnementale) et **endogènes** (lié aux incompatibilités génétiques) issu des simulations de Bierne *et al.* (2011). Une chaîne de 60 dèmes a été divisée en parcelles de 30 dèmes formant l'habitat 1 (points bleus) et l'habitat 2 (points verts). Le cline endogène (ligne rouge) est initialement positionné au dème 20 de l'habitat 1 (1). Un nouvel allèle exogène (adaptation locale) apparaît dans le premier dème de l'habitat 1 (flèche bleue sur l'axe des abscisses) et se répand dans l'habitat 1 croisant le cline endogène (2). Le cline endogène se déplace de manière transitoire (3) et forme un cline à la frontière environnementale (4). Comme les clines endogènes et exogènes se chevauchent, leur couplage se poursuit et le cline endogène se déplace jusqu'à ce qu'il coïncide avec la frontière environnementale (5). Les flèches noires indiquent le mouvement du cline endogène. Figure tirée de Bierne *et al.* (2011).

IV. Présentation des modèles d'étude : deux taxons du complexe d'espèce *Ciona intestinalis* (Ascidacea)

Le genre *Ciona*, au sein de la famille des Cionidae, comprend 14 espèces nominales, dont *C. intestinalis* (Linnaeus, 1767). *C. intestinalis* est étudiée depuis très longtemps dans la discipline de l'embryogénèse (Wiley 1892; Morgan 1904). L'attention portée à ce taxon s'est accélérée depuis les années 1950 puisqu'il est devenu un modèle en biologie fondamentale, en particulier en biologie du développement des chordés (Satoh *et al.* 2014). Son génome (160 Mkb), 17 fois plus petit que celui de l'homme a été d'ailleurs l'un des premiers génomes de métazoaires séquencé (Dehal *et al.* 2002; attribué postérieurement à *C. robusta* – voir plus bas). Plus récemment, cette espèce est également devenue un modèle en écologie et biologie évolutive, notamment par son caractère d'espèce invasive en certaines parties du monde (Procaccini *et al.* 2011; Shenkar & Swalla 2011).

Décrite par Linnée sous le nom d'*Ascidia intestinalis* en 1767, cette espèce a fait l'objet d'une description très détaillée par Millar en 1953 sous le nom de *Ciona intestinalis* (à partir d'individus prélevés à la station de Millport en Ecosse), nomenclature encore acceptée à ce jour (World Register of Marine Species (Shenkar & Sanamyan 2015a)). Comme souligné par Pante *et al.* (2015a), les espèces sont des hypothèses de travail. L'accumulation de différents critères qui chacun fait écho à un concept d'espèce particulier est une méthodologie qui peut permettre de tester ces hypothèses et, le cas échéant d'en formuler de nouvelles (de Queiroz 1998; Barberousse & Samadi 2010). Il s'agit ici de la boucle de la taxonomie intégrative (*i.e.* « integrative taxonomic loop ») telle que décrite dans la Figure I.14, issue de l'article de Pante *et al.* (2015a). Brièvement, cette approche consiste à analyser des caractères de différentes natures (*e.g.* caractères morphologiques, éthologiques, génétiques, écologique), en utilisant différentes méthodes (*e.g.* observations, inférences biogéographiques, croisements expérimentaux), chez deux espèces hypothétiques. Passées au filtre du plus grand nombre de critères (*e.g.* critères phénétiques, phylogénétiques et biologiques), cette approche vise à proposer les hypothèses les plus robustes possibles quant à la délimitation des espèces.

Le taxon *Ciona intestinalis* est un bel exemple de la mise en œuvre de ces différents critères, de la ré-évaluation des hypothèses d'espèces et de la complexité dans la délimitation de ces espèces. En effet, à l'instar de nombreuses espèces en milieu marin (Appeltans *et al.* 2012), des études moléculaires ont peu à peu apporté des arguments laissant penser que ce taxon était en fait composé d'un ensemble de quatre espèces cryptiques (Zhan *et al.* 2010). Puis d'autres types d'arguments ont été apportés, notamment basés sur la morphologie confortant l'hypothèse de plusieurs espèces au sein de l'espèce nominale *Ciona intestinalis*. Cependant, il n'en reste pas moins des parts d'ombres rendant compte d'une histoire évolutive complexe en lien avec le processus graduel qu'est la spéciation et la porosité des barrières aux flux de gènes entre espèces. Je dresse ici un bref état des lieux de ces recherches menées sur l'espèce nominale *C. intestinalis*, en me focalisant sur les deux taxons sur lesquels mon travail de thèse a été basé (*i.e.* *Ciona robusta* et *C. intestinalis*, Figure I.15) et sur lesquels la quasi-totalité des études ont été réalisées à ce jour.

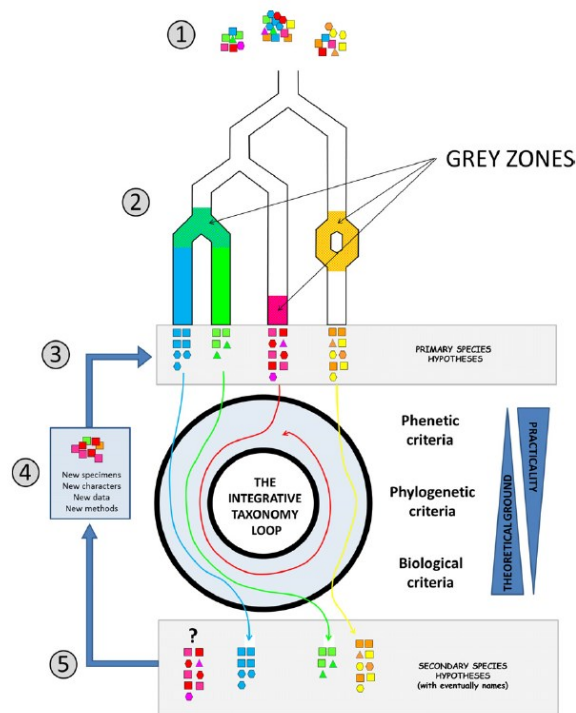


Figure I.14. **Principe de la boucle de la taxonomie intégrative** (Pante et al. 2015a). La première étape (1) est l'échantillonnage représentatif de la diversité populationnelle et/ou phylogénétique. (2) Les espèces échantillonnées peuvent avoir atteint différentes étapes dans le processus de spéciation, y compris être dans la « zone grise » définie par de Queiroz (1998) où, par exemple, la divergence est encore récente (lignées bleue et verte), les caractères indifférenciés (lignées rose et rouge) ou les populations ne sont passées que par des divergences temporaires (en jaune et orange). (3) une première hypothèse est posée sur la base d'un critère (i.e. « primary species hypotheses »), puis on entre dans la boucle (4) où l'on cherche à accumuler de nouvelles « preuves » sur la base de nouveaux critères (i.e. critères biologiques, phylogénétique et phénétique) ou échantillonnages afin (5) de valider la première hypothèse ou de formuler de nouvelles hypothèses (i.e. « secondary species hypotheses »).



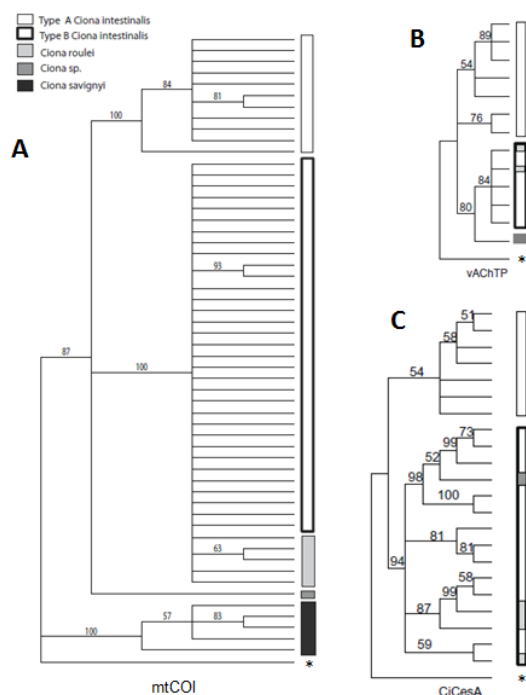
Figure I.15. ***Ciona robusta* (type A)** (individu à la tunique nacré et aux protubérances visibles sur la tunique) **et *Ciona intestinalis* (type B)** (individus à la tunique transparente possédant une corolle jaune autour des siphons inhalant et exhalant). Cette photo prise dans le port de Brest-Moulin Blanc en Bretagne présente des spécimens facilement assignables aux deux espèces. La reconnaissance morphologique n'est toutefois pas toujours aussi facile sur le terrain. © Wilfried Thomas, Station Biologique de Roscoff.

4.1. De *Ciona intestinalis* à *C. robusta* (*C. intestinalis* type A) et *C. intestinalis* (*C. intestinalis* type B)

Différents résultats ont dans les dix dernières années conduit à ré-évaluer le statut d'espèce du taxon *C. intestinalis*, conduisant à la proposition d'une nouvelle nomenclature:

4.1.1 Des divergences génétiques fortes et multi-marqueurs

La première étude ayant souligné la forte divergence « intra-spécifique » au sein de *Ciona intestinalis* date de 2005 : Suzuki et collaborateurs (2005), en se basant d'ailleurs sur des résultats préliminaires obtenus antérieurement par Simmen *et al.* (1999), font l'hypothèse de l'existence de « deux types », l'un dit « *Pacific type* » et l'autre « *British type* ». Cette hypothèse repose sur la forte divergence nucléotidique (5 à 50%) observée entre des séquences issues de cosmides et analysées sur un panel d'individus prélevés en Europe (différentes régions océaniques dont la Manche, la Mer d'Irlande, la Mer du Nord et la Mer Méditerranée) et dans le Pacifique Nord (Japon, Californie). Ils soulignent également la surprenante similarité génétique d'individus prélevés en Méditerranée et dans le Pacifique. Des conclusions similaires sont publiées quelques années plus tard par Nydam & Harrison (2007, 2010) et Caputi *et al.* (2007) sur la base des séquences mitochondriales et nucléaires (voir un exemple en Figure I.16). Nydam & Harrison (2007) donnent le nom de *C. intestinalis* type A et *C. intestinalis* type B, aux « *Pacific type* » et « *British type* » définis par Suzuki *et al.* en 2005. Deux années plus tard, ces mêmes auteurs « découvrent » un nouveau type (appelé *C. intestinalis* type C) à Banyuls sur Mer en Méditerranée (Nydam & Harrison, 2007). Enfin, Zhan et collaborateurs (2010) publient une étude « décisive » dans laquelle sur la base de ses résultats et de ceux obtenus auparavant (Caputi *et al.* 2007; Nydam & Harrison 2007, 2010), ils proposent l'existence de 4 sous-espèces ou espèces cryptiques (un nouveau type, *C. intestinalis* type D ayant été trouvé en Mer Noire) au sein de l'espèce nominale *C. intestinalis*.



Ainsi, ces différentes études montrent une divergence phylogénétique marquée au sein du taxon *C. intestinalis* permettant notamment de définir deux groupes monophylétiques, correspondant à deux taxons appelés *C. intestinalis* type A et *C. intestinalis* type B. Dans certains cas, une date de divergence entre les deux taxons a été estimée : les plus récentes et robustes estimations convergent vers une date moyenne aux alentours de 5-6 millions d'années (Tableau

I.1). D'autres données génétiques vont dans le sens d'une forte divergence généalogique et évolutive des deux nouveaux taxons : par exemple, Caputi *et al.* (2007) mettent en évidence de forts déficits en hétérozygotes dans des populations des deux espèces en utilisant 12 marqueurs nucléaires de type microsatellites supposés amplifier chez les deux espèces. Ces déficits en hétérozygotes peuvent en fait être mis en relation avec la présence d'allèles nuls (Dubois & Viard, données non publiées), qui est un signe de la faible conservation des régions génomiques où sont localisées les motifs microsatellites, et donc de divergence évolutive forte entre les deux taxons.

Tableau I.1. **Tableau récapitulatif des différentes études ayant mis en évidence de la divergence génétique et génomique entre *C. robusta* (type A) et *C. intestinalis* (type B), avant et pendant ma thèse.**

Référence	Type de marqueurs	% de divergence	Temps estimé
Suzuki <i>et al.</i> (2005)	Séquences de 3 cosmides (gènes codants)	5 à 50%	14 millions d'années
Nydam & Harrison (2007)	744 paires de bases (pb) du marqueur mitochondrial COI	12.4%	4.8 à 7.8 millions d'années
Nydam & Harrison (2010)	6 gènes nucléaires	2.9 à 8.0 %	-
Caputi <i>et al.</i> 2007	2578 pb de séquences nucléaires concaténées	7.7% de substitutions non synonymes	-
Caputi <i>et al.</i> 2007	525 pb du marqueur mitochondrial COI	11.3%	-
Iannelli <i>et al.</i> (2007)	Séquence complète du génome mitochondrial (Mitogénome)	Moyenne de 5% de substitutions non synonymes	-
Roux <i>et al.</i> (2013)	Transcriptome complet	Moyenne de 14.4% de substitutions synonymes	2.7 à 5.5 millions d'années

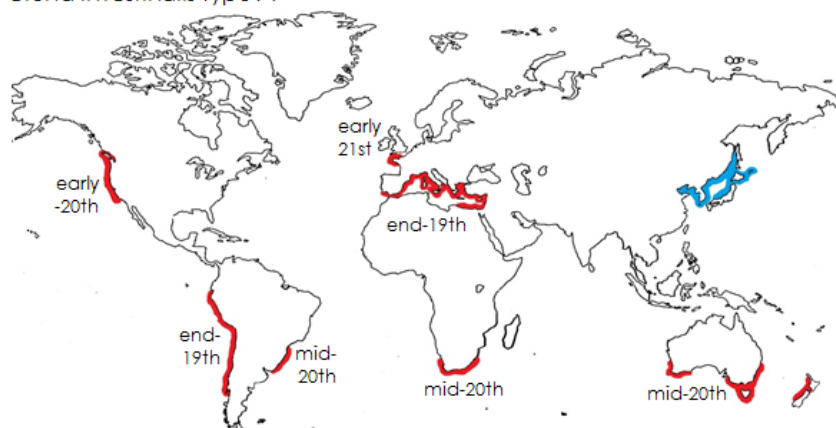
4.1.2 Des distributions essentiellement allopatriques, bien que fortement influencées par l'homme

Les deux taxons *C. intestinalis* type A et *C. intestinalis* type B sont largement distribués à l'échelle mondiale (Caputi *et al.* 2007; Figure I.17), ce qui leur a valu l'appellation de taxons « cosmopolites ». Ils sont en majorité en situation allopatrique l'un par rapport à l'autre (*i.e.* présent seul dans la région géographique considérée), ce qui est un argument d'ordre biogéographique en faveur d'un statut d'espèce. Néanmoins, les études phylogéographiques (séquences mitochondriales) et génétiques (microsatellites) de Zhan *et al.* (2010, 2012) ont montré une faible structure génétique entre les populations de chacune des deux espèces. Ce résultat laisse supposer que la distribution « cosmopolite » observée chez *C. intestinalis* type A et *C. intestinalis* type B résulterait pour partie d'événements récents d'introduction biologique à une échelle mondiale. Cependant, du fait de la découverte récente de ces deux taxons, l'attribution du statut d'espèce indigène ou non-indigène dans les différentes régions géographiques n'est pas toujours établie avec certitude (Figure I.17).

Ainsi, *Ciona intestinalis* type A est supposée originaire du Nord-Ouest Pacifique (côtes asiatiques) mais elle aurait été introduite dans tous les océans (excepté l'Océan Antarctique). *Ciona intestinalis* type B a été décrite originellement dans l'Atlantique Nord-Est mais elle est décrite comme introduite en mer Jaune (entre la Chine et la Corée ; Zhan *et al.* 2010). En Atlantique Nord-Ouest (*i.e.* en particulier dans la province maritime canadienne de la Nouvelle-Ecosse), elle est définie comme cryptogénique, à l'instar de nombreuses espèces d'invertébrés marins de cette région et qui sont trouvés également dans l'Atlantique Nord-Est (Haydar 2012). Cela rappelle ici le cas du gastéropode marin *Littorina littorea* à propos duquel le débat sur son statut indigène versus non-indigène dans cette région est toujours en cours (Chapman *et al.* 2008; Cunningham 2008).

Il n'existe à ce jour qu'une seule zone de sympatrie (i.e. coexistence dans la même région) clairement établie à l'échelle mondiale : la Manche Occidentale et Bretagne Sud. Cette situation de sympatrie résulterait de l'introduction récente de *C. intestinalis* type A dans l'aire de distribution naturelle de *C. intestinalis* type B. La présence de *C. intestinalis* type B en mer Jaune laisse supposer l'existence d'une seconde zone de sympatrie dans l'aire de distribution naturelle de *C. intestinalis* type A mais cette situation n'a été citée qu'une seule fois (Zhan *et al.* 2010) et pas confirmée depuis.

Ciona intestinalis type A



Ciona intestinalis type B



Figure 1.17. Distribution à l'échelle mondiale de *Ciona robusta* (type A) et *C. intestinalis* (type B) sur la base des données de la littérature. En bleu sont représentées les régions où les deux taxons sont considérés comme indigènes, en rouge les régions où ils sont considérés comme non-indigènes et en vert, où le statut est celui d'un taxon cryptogénique (i.e. statut non défini). La période approximative de la première observation, en dehors des aires de distribution naturelle, est donnée pour chacune des régions. Figure réalisée à partir des informations issues de Caputi *et al.* (2007), Zhan *et al.* (2010) et Procaccini *et al.* (2011).

4.1.3 Des critères morphologiques diagnostiques

Très récemment (au printemps 2015), des travaux de taxonomie morphologique ont montré l'existence de critères morphologiques permettant de distinguer *C. intestinalis* type A et *C. intestinalis* type B au stade adulte (Brunetti *et al.* 2015) et au stade larvaire (Pennati *et al.* 2015). Sato et collaborateurs (2012) avaient déjà mis en évidence des critères permettant de distinguer les deux espèces au stade adulte mais avec l'objectif principal de réaliser un diagnostic rapide sur le terrain. Ces critères de « terrain » ont été largement utilisés dans plusieurs des travaux réalisés au cours de ma thèse. Ils seront détaillés ultérieurement (Chapitre 1; Encadré 8).

La Figure 1.15 présentée au début de ce chapitre illustre certains des critères morphologiques utilisables à savoir : la couleur de la tunique (nacrée chez les individus du type A et transparente chez ceux du type B) et des siphons (souvent jaune chez le type B) ainsi que la présence de protubérances sur la tunique chez le type A. Ce dernier est le principal caractère diagnostique retenu par Brunetti *et al.* (2015). Pennati *et al.* (2015) ont également montré des différences significatives sur la base de caractères morphométriques entre les larves nageuses des deux espèces (Figure 1.18), tels que la longueur du flagelle et celle de la tête pour ne citer que les caractères les plus facilement mesurables, ou la distance entre les ocelles et la zone de transition entre la tête et la queue.

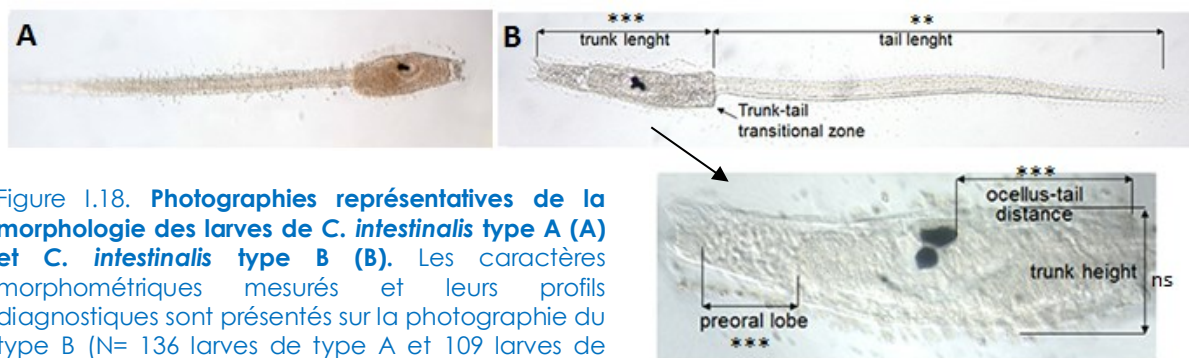


Figure I.18. Photographies représentatives de la morphologie des larves de *C. intestinalis* type A (A) et *C. intestinalis* type B (B). Les caractères morphométriques mesurés et leurs profils diagnostiques sont présentés sur la photographie du type B (N= 136 larves de type A et 109 larves de type B). Photographies modifiées de Pennati *et al.* (2015).

Brunetti *et al.* (2015) démontrent en outre que la présence de protubérances tuberculaires chez les individus adultes de *C. intestinalis* type A (Figure I.19) correspond à la description originale de l'espèce *Ciona robusta* décrite au Japon par Hoshino & Tokioka en 1967. Ces protubérances sont absentes de la description de l'espèce *C. intestinalis sensu* Millar (1953). La morphologie de *C. intestinalis* type B correspond, quant à elle, à l'ascidie *Ascidia intestinalis* décrite en Europe par Linné en 1767 et *C. intestinalis sensu* Millar (1953). Cependant l'absence de type déposé avec la description de *C. intestinalis sensu* Millar (1953) ne permet pas de valider complètement cette association. Brunetti *et al.* (2015) ont d'ailleurs déposé un néotype correspondant à un individu échantillonné à Roscoff et correspondant à la description de *C. intestinalis* type B, et donc selon leur étude à *C. intestinalis sensu* Millar (1953).

A l'issue de leur travail, Brunetti et collaborateurs (2015) valident l'existence de deux espèces, qui ne sont plus cryptiques et propose de « ressusciter » le nom d'espèce *C. robusta*. La nouvelle nomenclature qu'ils proposent est donc que ***C. intestinalis* type B, espèce européenne, soit nommée *C. intestinalis*, et que *C. intestinalis* type A, espèce asiatique, soit nommée *C. robusta***. Ces travaux d'alpha-taxonomie n'ont été acceptés que très récemment dans WoRMS, le 16 septembre 2015 (Shenkar & Sanamyan 2015b). Ainsi les deux espèces sont nommées depuis ce jour, *C. robusta* et *C. intestinalis*.

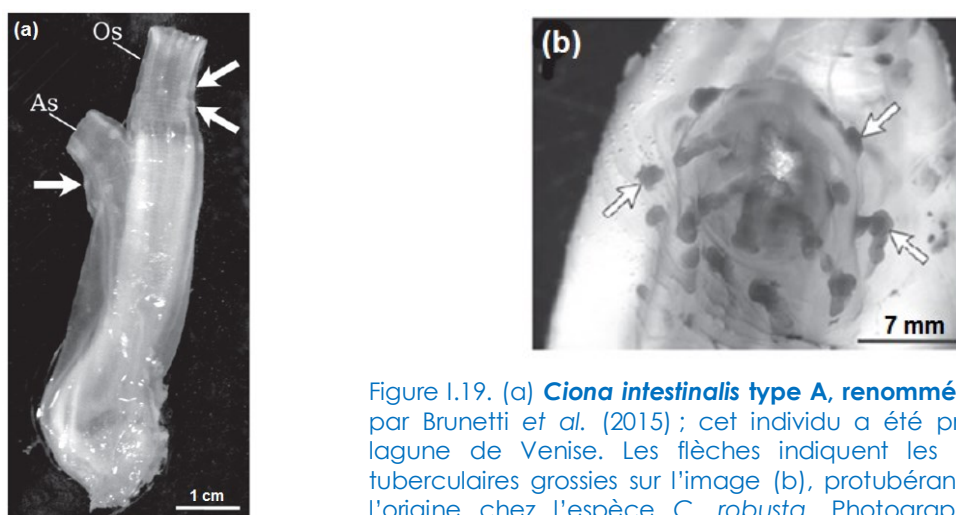


Figure I.19. (a) *Ciona intestinalis* type A, renommé *Ciona robusta* par Brunetti *et al.* (2015) ; cet individu a été prélevé dans la lagune de Venise. Les flèches indiquent les protubérances tuberculaires grossies sur l'image (b), protubérances décrites à l'origine chez l'espèce *C. robusta*. Photographies tirées de Brunetti *et al.* (2015).

Remarque importante : la nouvelle nomenclature proposée par Brunetti *et al.* (2015) ayant été formellement acceptée au moment de la rédaction de ce manuscrit de thèse, j'utiliserai les noms de *Ciona robusta* et *Ciona intestinalis*, excepté pour un article publié.

4.2. Des zones d'ombre rendant compte d'une histoire évolutive complexe

Comme présenté dans l'encadré 3, la spéciation est un processus graduel durant lequel des populations en cours de divergence sont soumises à des processus démographiques et migratoires pouvant les conduire à être en contact. Peuvent ainsi se succéder au cours de leur histoire évolutive des alternances entre des périodes en allopatrie et des périodes en sympatrie durant lesquelles des flux de gènes peuvent se produire si l'isolement reproductif entre les espèces n'est pas complet. *Ciona robusta* et *C. intestinalis* illustrent bien ces processus historiques complexes qui peuvent compliquer le travail de délimitation des espèces.

4.2.1. Des contacts secondaires historiques

En 2013, les travaux de Roux et collaborateurs (2013), basés sur une étude du transcriptome complet, ont apporté des éléments majeurs dans la compréhension de l'histoire évolutive des taxons *C. robusta* et *C. intestinalis*. L'objectif premier de leur étude était d'évaluer la fiabilité de méthode ABC (« Approximate Bayesian Computation »; Beaumont et al. 2002) pour inférer l'histoire démographique et évolutive d'espèces en cours de divergence et évaluer l'importance de l'hétérogénéité des taux d'introgession entre les génomes des deux taxons. Les transcriptomes complets de 10 individus de *C. robusta* (provenant de Californie et de Méditerranée) et de 10 individus de *C. intestinalis* (Nouvelle Ecosse, Norvège et Sud Bretagne) ont été obtenus. Quatre scénarios de spéciation avec des patrons de migration différents ont été comparés (Figure I.20). Pour chaque scénario incluant de la migration (i.e. CM, AM, SC, Figure I.20), l'hétérogénéité des taux d'introgession a été testée en comparant un modèle incluant un même taux d'introgession pour tous les locus (i.e. migration homogène) et un modèle alternatif incluant des taux d'introgession indépendants entre les locus (i.e. migration hétérogène).

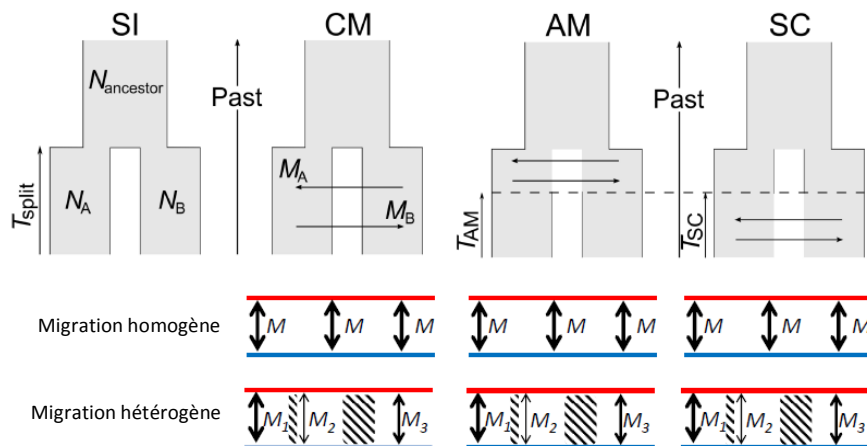


Figure I.20. **Schéma des scénarios de spéciation testés** (SI : divergence stricte, CM : taux de migration constant, AM : migration passée, SC : contact secondaire postérieur à leur divergence). N_{ancestor} , N_A et N_B : tailles effectives respectives de la population ancestrale, de la « population » *C. robusta*, de la « population » *C. intestinalis*. T_{split} : temps écoulé depuis la divergence initiale. T_{AM} : temps écoulé depuis l'arrêt des flux de gènes entre les deux populations. T_{SC} : temps écoulé depuis le contact secondaire entre les deux populations précédemment isolées. Les temps T sont exprimés en nombre de générations. Les taux de migration efficaces M_A et M_B sont exprimés en unités $4Nm$, où m est la proportion de la « population » composée de migrants provenant de l'autre « population » à chaque génération.

La comparaison de ces différents scénarios a montré que le scénario de contact secondaire incluant une migration hétérogène était le plus probable (probabilité de 0.99) pour expliquer la distribution du polymorphisme partagé entre les individus des deux espèces. Selon ce scénario, la divergence entre les deux espèces a été estimée dans une période allant de 2.70 à 5.48 millions d'années (i.e. correspondant à la période du Pliocène) avec un contact secondaire

dont l'âge a été estimé à 15,500 ans (95%CI : 4,300 - 56,800 ans). Il est important de noter que cet intervalle de confiance exclue la valeur 0 et donc la période contemporaine. Une comparaison locus par locus des scénarios de migration a montré qu'environ 20% des locus avaient été l'objet d'évènements d'introggression, dont 99% avec une introgression unidirectionnelle (introgression uniquement de *C. robusta* vers *C. intestinalis* ou uniquement de *C. intestinalis* vers *C. robusta*). Du fait de ces flux de gènes interspécifiques et caractérisés par des taux hétérogènes, le génome des deux espèces est constitué d'allèles issus de l'une ou l'autre des deux espèces : on parle alors de génomes mosaïques. Cette étude apporte la preuve que les deux taxons étaient dans un passé proche non isolés reproductivement.

4.2.2 Une interfertilité possible mais des schémas ambigus et non-concordants

L'isolement reproductif est un critère clé dans la définition d'une espèce, ce critère étant associé au concept biologique de l'espèce (Mayr 1963). Or, malgré la divergence ancienne entre les deux taxons (voir Tableau I.1, divergence équivalente à celle estimée entre l'homme moderne et le ouistiti; Perelman *et al.* 2011), nous avons vu dans le paragraphe précédent que des flux de gènes historiques avaient eu lieu lors d'un contact secondaire passé. Par ailleurs, l'isolement reproductif est également incomplet dans les populations contemporaines : en effet, des croisements hétérospécifiques sont réalisables en laboratoire entre les deux taxons (Suzuki *et al.* 2005; Caputi *et al.* 2007; Sato *et al.* 2012; Sato *et al.* 2014). Il existe cependant des interrogations quant aux degrés et modalités de l'isolement reproductif. En effet, des variations du succès de fécondation sont observées en fonction de l'espèce utilisée comme voie maternelle (*i.e.* les ovocytes).

Suzuki et collaborateurs (2005) ont réalisé des croisements à partir d'individus de *C. robusta* prélevés au Japon et de *C. intestinalis* prélevés en Ecosse (Oban). Les croisements hétérospécifiques utilisant des ovocytes de *C. intestinalis* et du sperme de *C. robusta* montrent des taux de fécondation aussi importants que ceux utilisant les ovocytes et le sperme de la même espèce (ca. 99.4% \pm 1.4% d'ovocytes fécondés, Figure I.21.A). A *contrario*, les croisements hétérospécifiques utilisant des ovocytes de *C. robusta* et du sperme de *C. intestinalis* montrent des taux de fécondation beaucoup plus faibles (ca. 38.4% \pm 31.6% d'ovocytes fécondés, Figure I.21.A). Des tests préliminaires réalisés à la Station Biologique de Roscoff (Schires, Lasbleiz, Viard, données non publiées) avec des individus des types A et B en Manche semblent confirmer les résultats de Suzuki *et al.* (2005).

Caputi et collaborateurs en 2007 montrent des faibles taux de fécondation quel que soit le croisement hétérospécifique réalisé, *i.e.* entre 5 et 30% d'ovocytes fécondés (% d'œufs en divisions cellulaires représenté par des barres d'histogramme noires dans la Figure I.21.B) en utilisant des individus de *C. intestinalis* prélevés en Manche et des individus de *C. robusta* prélevés en Manche et en Méditerranée. A noter dans leur étude qu'ils obtiennent également de faibles taux de fécondation lors de croisements homospécifiques entre individus de *C. robusta* provenant de zones géographiques différentes. Il pourrait donc s'agir ici d'artefacts expérimentaux.

Des résultats différents sont en revanche obtenus par Sato et collaborateurs (2014), en utilisant des individus des deux espèces prélevés en Manche Occidentale : ces auteurs montrent de forts taux d'éclosion quel que soit le croisement hétérospécifique réalisé et donc ne note pas cette asymétrie de croisement révélée notamment par Suzuki *et al.* (2005) (Figure I.21.C).

L'ensemble de ces études montrent des résultats ambigus. Cependant, il est difficile de faire la comparaison entre ces études sachant que 1) les individus ne sont pas forcément prélevés dans la même zone géographique et qu'il peut y avoir un effet du transport sur le succès de reproduction des individus (comme suggéré pour les croisements réalisés par Caputi *et al.* 2007), et que 2) les variables mesurées ne sont forcément les mêmes. L'obtention des hybrides de première génération est cependant réalisable. Qu'en est-il de leur survie et de leur fertilité ? Les résultats sur ce point sont encore plus ambigus. Une seule étude par Sato et collaborateurs (2014)

a montré la possibilité de générer une descendance F1 viable et fertile. Ces auteurs ont obtenu des larves à partir d'un croisement de type backcross (croisement entre hybrides-F1 et lignées parentales). Cependant, le génotype de ces individus hybrides-F1 et F2 n'a pas été vérifié et sachant que ces croisements n'étaient pas bi-parentaux (i.e. impliquant des mélanges de gamètes issus de deux individus différents de chaque espèce), on ne peut pas exclure des effets de contamination lors du prélèvement des gamètes dans les croisements supposés être hétérospécifiques.

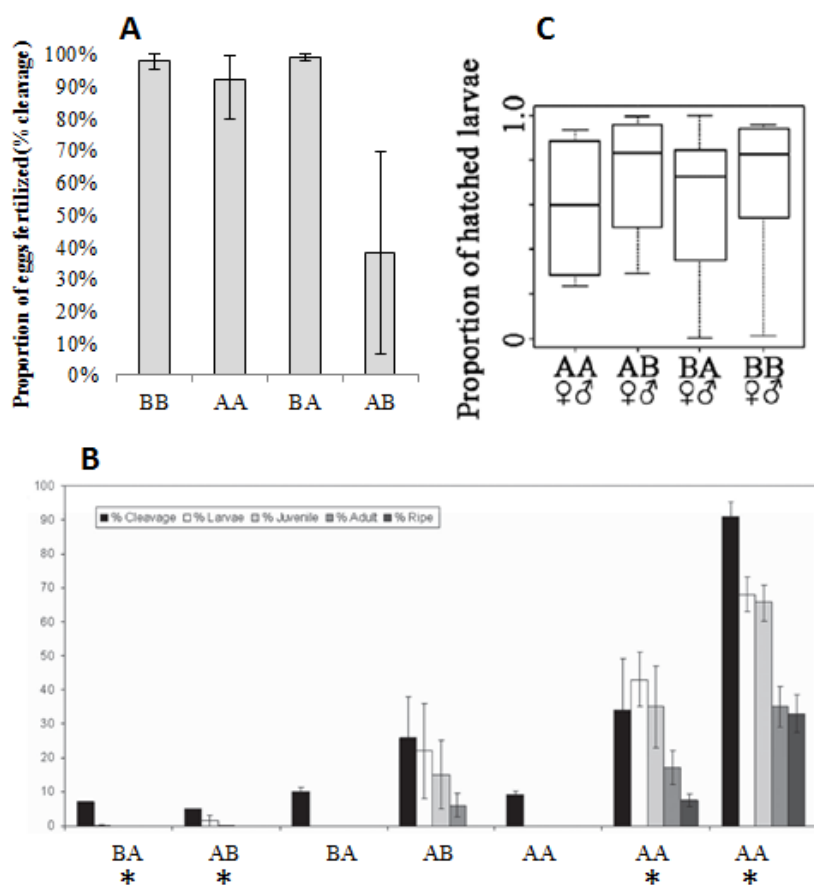


Figure 1.21. Succès de fécondation pour des croisements homospécifiques (i.e. utilisant des gamètes mâles et femelles de la même espèce, nommés AA et BB) et hétérospécifiques (i.e. utilisant des gamètes mâles et femelles d'espèce différentes, nommés AB et BA). La première lettre indique l'espèce pour laquelle les gamètes femelles ont été utilisés. (A) Figure issue de Suzuki *et al.* (2005) ; les individus de *C. robusta* (type A) et de *C. intestinalis* (type B) ont été prélevés respectivement au Japon et en Ecosse. (B) Figure tirée de Caputi *et al.* (2007) ; les individus utilisés viennent de Manche Occidentale et de Méditerranée pour *C. robusta* et de Manche Occidentale pour *C. intestinalis*. Les croisements utilisant des individus de la même région sont indiqués par un astérisque. (C) Figure tirée de Sato *et al.* (2014) ; les individus viennent de la Manche Occidentale pour les deux espèces.

4.3. Une zone de sympatrie unique (en Manche) dans laquelle des hybridations semblent possibles

La Manche Occidentale et la Bretagne Sud forment actuellement la seule zone de sympatrie confirmée entre les deux espèces. Ce contact secondaire est lié à l'introduction très récente de *C. robusta*, probablement au début du 21^{ème} siècle, dans l'aire de distribution naturelle de *C. intestinalis*. L'état des connaissances concernant les deux espèces dans leur aire de sympatrie est cependant fragmentaire. La seule étude disponible avant ma thèse était celle réalisée par Nydam & Harrison (2011). Il faut noter qu'hormis des résultats très intéressants sur l'écologie des deux espèces, une avancée méthodologique importante a été publiée avec cette étude : la mise au point de 6 marqueurs diagnostiques* des deux espèces, utilisables avec une simple technique de PCR-RFLP (digestion enzymatique d'un produit de PCR). Ces marqueurs avaient été obtenus par l'analyse des séquences de marqueurs nucléaires obtenues dans une étude précédente (Nydam & Harrison 2010; Figures 1.16.B et 1.16.C).

En utilisant des suivis de terrain et des échantillonnages en vue de génotypage avec ces marqueurs, Nydam & Harrison (2011) montrent : 1) la coexistence des deux espèces en Manche Occidentale en 2007 mais la disparition de *C. robusta* dans un échantillonnage réalisé en 2009

(Figure I.22), 2) la présence de rares individus présentant des profils génétiques compatibles avec un statut d'hybride F1 ou de backcross récents (de l'ordre de 1 à 5% d'introgression nucléaire, Figure I.22). Les auteurs avaient également constaté une diminution de la proportion d'individus présentant des profils génétiques « hybrides » entre 2007 et 2009, un schéma qu'ils avaient attribué à la disparition de *C. robusta* dans cette région (Figure I.22). Cependant, les observations du laboratoire d'accueil ne vont pas dans ce sens.

Ainsi, cette région pourrait représenter une situation idéale pour étudier les conséquences écologiques et évolutives des contacts secondaires dus aux introductions biologiques (i.e. un « laboratoire naturel » pour citer Hewitt (1988)). Cette situation de contact permettrait ainsi d'analyser le potentiel d'hybridation entre les deux espèces, évolutivement divergentes mais caractérisées par un isolement reproductif incomplet. Si tel est le cas, ce qui serait en accord avec les données expérimentales, l'isolement incomplet pourrait remettre en cause le statut d'espèce, sous le critère d'isolement reproducteur.

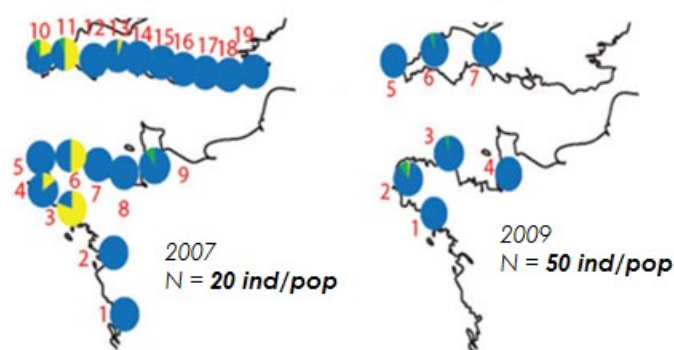


Figure I.22. Proportion relative d'individus de *C. robusta* (type A, en jaune), *C. intestinalis* (type B, en bleu) et des individus montrant des profils mixtes (i.e. possédant des allèles des deux espèces, en vert) en 2007 et 2009. Figure tirée de Nydam & Harrison (2011).

4.4 Les connaissances sur l'écologie des deux espèces sont rares et indirectes

La plupart des travaux en écologie ne différencie pas *C. robusta* et *C. intestinalis*, y compris très récemment par exemple lors d'études de dynamique de populations (Jofre Madariaga *et al.* 2014) ou d'écologie des communautés (Aldred & Clare 2014). On peut attribuer cette lacune au fait que 1) la découverte des espèces cryptiques est le fait d'études de génétique des populations et phylogéographie, des sujets malheureusement peu cités ou connus dans la communauté des écologues (la réciproque est vraie pour des travaux en écologie) 2) le temps nécessaire à valider puis diffuser de nouvelles hypothèses d'espèce et nomenclature est long et 3) au temps très bref écoulé depuis la proposition d'une nouvelle nomenclature par Brunetti *et al.* (2015). Il est donc difficile de dresser une carte d'identité spécifique des espèces *C. robusta* et *C. intestinalis*. On peut cependant souvent émettre des hypothèses sur l'espèce en fonction de la zone géographique étudiée ou de l'origine des échantillons étudiés puisque leur distribution est largement allopatrique (Figure I.17). Les indications données ci-dessous résultent d'une telle approche.

4.3.1 Un cycle de reproduction similaire

En termes de biologie et de reproduction, *Ciona robusta* et *C. intestinalis* sont des espèces hermaphrodites simultanées, caractérisées par une légère protandrie : les gamètes mâles sont produits en premier, puis les gamètes femelles pendant que la production des gamètes mâles se poursuit. La fécondation est externe (i.e. les gamètes mâles et femelles sont libérés dans le milieu). Des gènes d'incompatibilités empêchent l'autofécondation (Harada *et al.* 2008; étude réalisée chez *C. robusta* ; Dubois, Bouchemousse & Viard, données non publiées chez *C. intestinalis*). Les deux espèces présentent le cycle de vie « classique » des invertébrés marins à cycle benthopélagique (Figure I.23) sauf que la durée du cycle de vie est courte (estimée entre 3 mois et 2 ans en fonction de la température du milieu pour *C. intestinalis* (Dybern 1965)). Elle possède également une phase larvaire à très courte durée de vie (comme la plupart des ascidies (pour

une revue voir Lambert (2005)), n'excédant pas 48h à 72h à 18°C après la fécondation (Svane & Havenhand 1993; Carver *et al.* 2006).

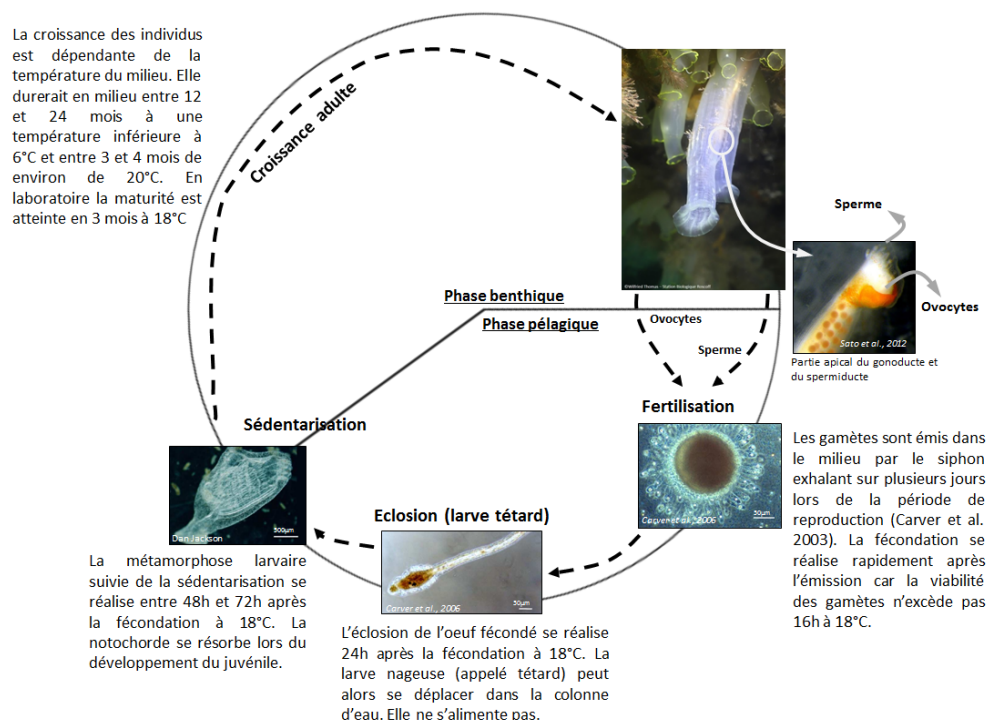


Figure I.23. Cycle de vie de l'espèce nominale *Ciona intestinalis* (Linnaeus 1767), qui a été validé en laboratoire pour les deux espèces. Les détails notés dans cette figure proviennent notamment des travaux de revue de Carver *et al.* (2006) et de Dybern (1965).

4.3.2. Des habitats communs mais des niches probablement partiellement chevauchantes

La majorité des études sur *C. robusta* et *C. intestinalis* a été réalisée dans des habitats portuaires où, avec d'autres ascidies, elles forment une part importante de la communauté sessile des structures artificielles immergées de ces habitats (appelé « biosallisure » en français et « fouling » en anglais ; Figure I.24). Ces habitats artificiels sont caractérisés par des assemblages d'espèces originaux : ils ne sont pas des substituts des milieux naturels et une proportion importante d'espèces non-indigènes y est trouvée (Bulleri & Chapman 2010; Connell 2001; Mineur *et al.* 2012); voir Lopez-Gentil *et al.* (2015) pour un exemple concernant les ascidies). Les deux espèces réunies représentent une biomasse importante au sein des communautés des habitats portuaires: en Bretagne, la biomasse de *Ciona* sp. peut atteindre jusqu'à 2000 individus par m² sous les pontons (Koechlin 1977). Les ciones sont aussi présentes sur la partie immergée des cordages et des piliers, sur les bouées et les coques des bateaux (Figure I.24). Elles sont d'ailleurs considérées comme une nuisance dans les ports des régions où elles ont été introduites (dans les ports du sud de la Californie (Lambert & Lambert 1998); dans les ports de la côte Turque (Kocak *et al.* 1999); dans les élevages mytilicoles de Nouvelle-Ecosse (Cayer 1999)).

L'habitat naturel de ces espèces est finalement moins bien connu même si des populations ont été étudiées dans leurs habitats naturels notamment en Scandinavie pour *C. intestinalis*. Par exemple, Dybern (1965) note sa présence dans les eaux peu profondes des fjords et des bras de mer ou attachée sur des lames de zostères et de macroalgues (Dybern 1969; Petersen & Riisgard 1992). Des populations de *C. intestinalis* ont été également décrites dans des habitats profonds (au-delà de 30-40m de profondeur) en Islande, Suède et aux îles Féroé. Aux environs de Roscoff (Manche Ouest), des individus ont été observés sur des rochers à 35m de fond en Baie de Morlaix par les plongeurs de la Station Biologique de Roscoff, ainsi qu'au cours de dragages réalisés en baie de Saint-Brieuc sur des profondeurs de 10-20 mètres sur des « fonds à crépidules » (*Crepidula fornicata*) (F. Viard, observations personnelles).

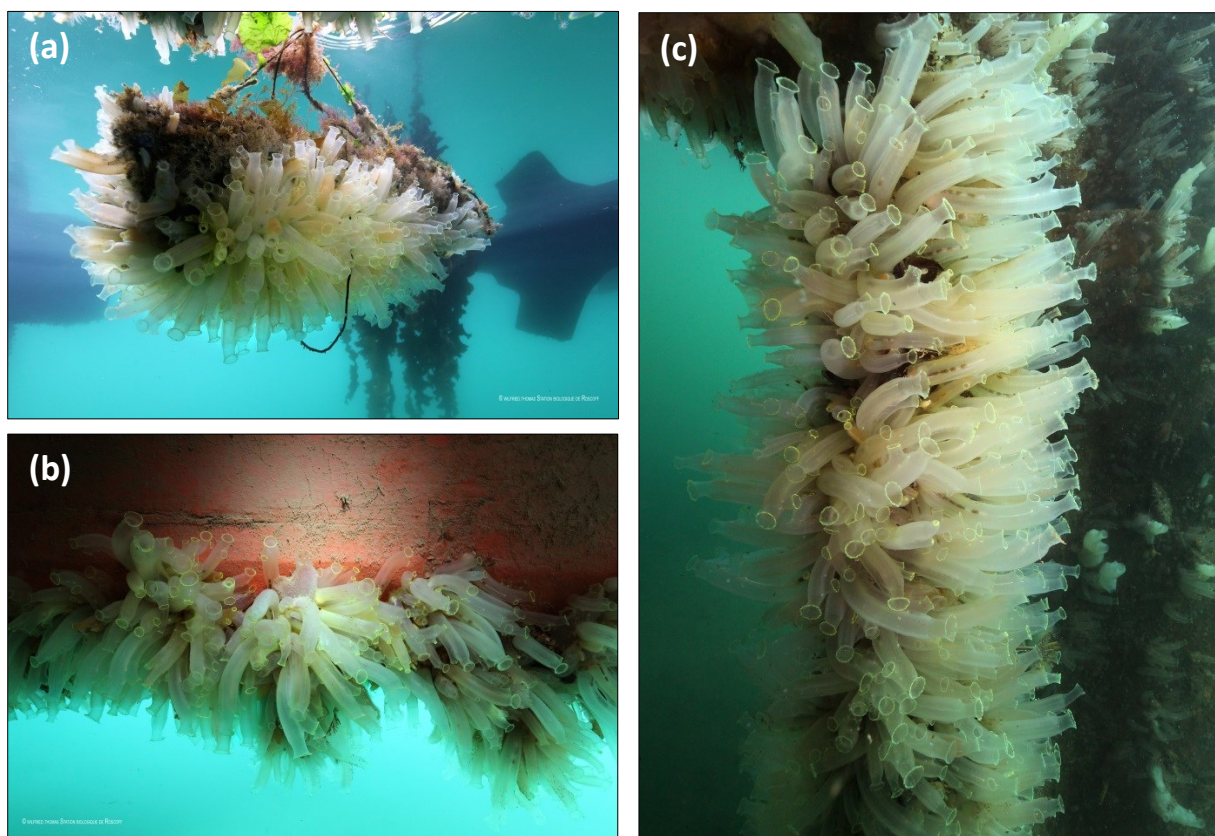


Figure 1.24. Photographies illustrant l'importance du « fouling », ici par *Ciona intestinalis*, sur les structures artificielles d'habitats portuaires en Bretagne: (a) sur un collecteur expérimental immergé, (b) sur la coque d'un navire de plaisance et (c) sur un cordage pendant au ponton. © Wilfried Thomas, Station Biologique de Roscoff.

En termes de préférences environnementales, la collecte de données spécifiques de l'une ou l'autre des deux espèces (concernant principalement la température et la salinité, considérées comme les principales variables environnementales structurant la distribution des ascidies, Lambert 2005) ne peut se faire que dans les régions où les deux espèces sont en situation d'allopatrie. Globalement, les espèces *C. robusta* et *C. intestinalis* sont considérées respectivement comme des espèces des eaux tempérées chaudes et des eaux tempérées froides (Proccacini et al. 2011). Leur distribution géographique respective en témoigne. *C. robusta* semble en effet être largement présente dans des eaux où les températures minimales et maximales sont élevées, entre 14 et 25 °C au Japon (Yamaguchi 1975) et entre 12 et 28°C en Méditerranée (Caputi et al. 2015) alors que *C. intestinalis* est trouvée généralement dans des eaux entre 2 et 19°C en Nouvelle-Ecosse (Vercaemer et al. 2011) et entre -1 et 20°C en Scandinavie (Dybern 1965). De par ces affinités de gammes de température différente, on peut s'attendre à observer, dans la zone de sympatrie, des décalages de phénologie entre les deux espèces au cours des saisons. Concernant la salinité, *C. intestinalis* est considérée comme une espèce euryhaline, tolérant des variations de salinité allant de 11 à 33 en Scandinavie (Dybern 1967), tandis que pour *C. robusta*, le manque de données dans les régions où elle est actuellement distribuée ne permet pas d'évaluer ses préférences halines.

V. Objectifs de la thèse et structure du document

Comme montré dans la section précédente, dans la zone de sympatrie, très peu de données existent sur le cycle de vie, les préférences écologiques, les communautés spécifiques des deux espèces. **Un travail d'écologie sur le terrain est à mener pour documenter les schémas de co-existence des deux espèces et comprendre leur dynamique respective dans la zone de sympatrie, en Manche Occidentale et Bretagne Sud. Ces éléments sont nécessaires pour poser le cadre d'une étude plus ciblée sur les conséquences éco-évolutives du contact secondaire entre ces deux espèces.** Si l'on s'en tient aux résultats obtenus en laboratoire démontrant l'interfertilité des deux espèces, une des conséquences éco-évolutives importante attendue en milieu naturel est la présence d'individus hybrides. **Cette zone serait ainsi une situation idéale pour étudier les processus d'hybridation et d'introgession entre deux espèces, l'une indigène et l'autre non-indigène à la suite de leur remise en contact par les activités humaines.** Il faut néanmoins pouvoir quantifier l'importance de cette hybridation en milieu naturel.

Au début de ma thèse, dans la zone de sympatrie, l'état des connaissances se résumait aux travaux réalisés par Nydam & Harrison (2011). Partant de ces résultats et de données obtenues antérieurement au laboratoire et sur le terrain à la Station Biologique de Roscoff, mon travail de thèse avait pour objectif général d'étudier les conséquences écologiques et évolutives dues au contact contemporain entre les deux taxons *C. robusta* et *C. intestinalis*, en travaillant au cœur de la zone de sympatrie, le long du littoral breton de la Manche Ouest. Il s'agissait en particulier 1) de documenter le schéma de coexistence des deux espèces dans leur aire de sympatrie et 2) d'analyser l'importance de l'hybridation en milieu naturel et ses conséquences sur la diversité et la structure des populations des deux espèces. Néanmoins, au cours de ma thèse, d'autres résultats sont apparus dans la littérature qui devaient être pris en compte dans mon travail. En particulier :

- l'article de Roux et al. (2013) démontrant que *Ciona robusta* et *C. intestinalis* avaient été l'objet d'un contact secondaire historique survenu postérieurement à leur divergence ; un contact estimé entre 4300 et 56800 ans pendant lequel des flux de gènes importants avaient eu lieu entre ces deux espèces ;

- les travaux de Sato et al. (2014) documentant la viabilité et la fertilité d'hybrides F1 ;

- les travaux du groupe de Lucia Manni en Italie (Brunetti et al. 2015, Pennatti et al. 2015) dont les résultats m'étaient connus en 2014, du fait de leurs présentations à des colloques, confirmant la présence de caractères diagnostiques des deux espèces.

Ces différents résultats m'ont amené à définir de nouveaux objectifs et affiner mon travail de thèse autour de cinq grandes questions formant la structure de ce manuscrit :

- **Chapitre 1 : Dans quel type de communauté sont établies les deux espèces au sein des habitats portuaires ?**

Contexte : Il existe un manque de données décrivant les peuplements des milieux portuaires dans lesquels les deux espèces sont installées.

Questions spécifiques : Dans quel type de communautés sont établies les deux espèces ? Y-a-t-il des spécificités selon la présence de l'une ou l'autre ? Quelle est l'importance relative (densité) des deux espèces dans les habitats où elles co-existent ?

Méthode : approches d'écologie expérimentale et écologie de terrain

Ce chapitre rassemblant différents jeux de données et type d'observation sera présenté en français, ne faisant pas l'objet de publications spécifiques.

- **Chapitre 2 : La dynamique des populations est-elle similaire pour les deux espèces ?**

Contexte : A l'instar des données d'écologie des communautés, le manque de données sur la dynamique de populations des deux espèces est une lacune pour permettre de comprendre les conséquences écologiques (e.g. déplacement de niche) et évolutives (e.g. hybridation) du contact secondaire entre les deux espèces.

Questions spécifiques : Quelle est la dynamique de sédentarisation (recrutement des juvéniles) des deux espèces ? Existe-il un décalage temporel entre les deux espèces lors de la sédentarisation ? Y-a-t-il des spécificités pour l'une ou l'autre des deux espèces ?
Méthode : approches d'écologie expérimentale et moléculaire

Ce chapitre fait l'objet d'un article rédigé en anglais, en préparation pour la revue « Biological Invasions »

- **Chapitre 3 : Quel est le potentiel d'hybridation entre les deux espèces dans la zone de sympatrie ?**

Contexte : Les études sur le potentiel d'hybridation (coexistence, synchronie de reproduction) de ces espèces en milieu naturel sont quasiment inexistantes, excepté l'étude de Nydam & Harrison (2011). Cette dernière étude avait montré une disparition de *C. robusta* lors de leur dernier suivi.

Questions spécifiques : *C. robusta* est-elle établie durablement ? Quel est le degré de co-existence de ces espèces ? Sont-elles sexuellement matures au même moment (test de l'hypothèse d'un isolement reproductif lié à la phénologie) ? Observe-t-on des individus hybrides en milieu naturel ?

Méthodes : approche d'écologie de terrain et utilisation de marqueurs moléculaires diagnostiques

Ce chapitre fait l'objet d'un article en anglais qui a été publié dans la revue « Evolutionary Ecology »

- **Chapitre 4 : Quelle est l'importance relative des flux de gènes interspécifiques contemporains et historiques ?**

Contexte : Compte tenu des résultats du chapitre précédent et de ceux publiés par Roux *et al.* (2013), les signes d'introggression observés actuellement dans les populations naturelles peuvent être le résultat d'introggressions anciennes.

Questions spécifiques : Quelle est l'importance relative des introgressions anciennes par rapport aux flux de gènes interspécifiques contemporains sur les structures génétiques et génomiques observées actuellement ? Doit-on remettre en cause le caractère diagnostique des marqueurs utilisés dans la littérature pour distinguer les deux espèces ?

Méthodes : approche de génomique des populations, utilisant des SNPs isolés de transcriptomes complets

Ce chapitre fait l'objet d'un article en anglais en préparation pour la revue « Molecular Ecology »

- **Chapitre 5 : Quelle est l'histoire démographique et migratoire des deux espèces à l'échelle mondiale ?**

Contexte : Il n'existe pas d'études évaluant l'histoire migratoire historique et contemporaine des deux espèces dans la zone de sympatrie en regard de nombreuses données existantes dans les régions où elles sont en situation d'allopatrie. Par ailleurs, la reconstitution des aires de distribution des deux espèces est basée sur des hypothèses et peu de données d'observation directes.

Questions spécifiques : Les schémas de diversité génétique observés chez chacune des deux espèces dans la zone de sympatrie sont-ils atypiques par rapport à ce qui est observé à une échelle mondiale, dans des situations d'allopatrie ? Doit-on remettre en question le statut d'espèce indigène vs. non-indigène des deux espèces à une échelle mondiale ?

Méthodes : approche moléculaire basée sur une étude phylogéographique des deux espèces à l'échelle mondiale avec un focus particulier sur la zone de sympatrie.

Ce chapitre fait l'objet d'un article en anglais soumis à la revue « Scientific Reports »

- Chapitre 1 -

Dans quel type de communautés sont établies les deux espèces au sein des habitats portuaires ?

I. Contexte de l'étude

De par l'importance du trafic maritime comme vecteur d'introduction (cf. Introduction générale section 2), les habitats portuaires sont des têtes de pont (*i.e.* des points d'introduction privilégiés) pour les espèces non-indigènes en milieu marin. Ils forment de plus des réseaux facilitant l'établissement de ces espèces (Mineur *et al.* 2012; Airoidi *et al.* 2015). Ils jouent ainsi un rôle fondamental comme relais d'expansion de propagules vers d'autres habitats artificiels (*e.g.* plateformes, bouées, autres ports *etc.* (Wasson *et al.* 2001; Mineur *et al.* 2012; Lopez-Legentil *et al.* 2015), ainsi que vers le milieu naturel à l'échelle régionale, comme cela a été par exemple mis en évidence pour les ascidies coloniales *Botrylloides violaceus* et *Botryllus schlosseri* en Colombie Britannique (Simkanin *et al.* 2012). Avec l'urbanisation croissante des zones côtières et estuariennes à l'échelle mondiale, ces habitats artificiels, et en particulier les habitats portuaires, sont devenus des zones clés dans l'étude des processus d'introductions biologiques en milieu marin. Par ailleurs, ces habitats ne sont pas des substituts des habitats naturels : ils abritent des communautés formées par des assemblages originaux d'espèces (Bulleri & Chapman 2010), par exemple des espèces caractéristiques des milieux subtidiaux infralittoraux et intertidaux, normalement séparées en milieu naturel, coexistent sur ces substrats durs entraînant l'apparition de nouvelles interactions biotiques.

Des inventaires en temps limité (terme anglo-saxon : « Rapid Assessment Surveys » dont l'acronyme « RAS » sera utilisé dans ce document) réalisés par Francisco Arenas et ses collaborateurs (Arenas *et al.* 2006), en 2004, dans 12 ports du sud de l'Angleterre, ont montré la part importante d'espèces non-indigènes dans les communautés d'espèces peuplant ces habitats. Dans cette étude, les espèces de la faune et de la flore sessile avaient été ciblées. Les auteurs montrent que 25% des 80 espèces répertoriées sont non-indigènes ou cryptogéniques. Ce ratio entre espèces indigènes et non-indigènes est difficile à estimer en milieu naturel dans la même région, du fait d'importantes lacunes d'observation et de données d'inventaires dans les habitats subtidiaux sur substrats durs (des équivalents « naturels » des structures immergées dans les habitats portuaires) et du nombre important d'espèces marines cryptiques encore à découvrir (Appeltans *et al.* 2012). On peut toutefois faire remarquer que dans la seule zone couvrant 20 milles nautiques autour de Roscoff plus de 3000 espèces d'invertébrés et 800 espèces d'algues ont été dénombrées en milieu naturel (Inventaire de La Faune et de la Flore de Roscoff) ; avec « seulement » une centaine d'espèces non-indigènes répertoriées en Bretagne (données 2010 du

GIS Bretagne Environnement ; http://bretagne-environnement.org/fr_bretagneenvironnement/Media/Documentation/Bibliographies/Les-especes-marines-invasives-en-Bretagne), on peut donc penser que la proportion des espèces non-indigènes par rapport aux indigènes est très faible en milieu naturel. En accord avec l'hypothèse d'une plus grande importance relative des espèces non-indigènes en milieu portuaire, on remarquera que sur les 86 macro-organismes animaux et algaux introduits en Bretagne, au moins 25 sont répertoriés dans des habitats portuaires. Des données plus précises sont disponibles dans d'autres régions. Par exemple, Airolidi et collaborateurs ont comparé les peuplements d'ascidies entre des structures artificielles de type ports de plaisance, digues, brise-lames etc. et des habitats rocheux naturels le long des côtes Nord de la mer Adriatique (Airolidi et al. 2015). Ces auteurs ont montré une présence de deux fois moins importantes des espèces indigènes dans les peuplements d'ascidies occupant les structures artificielles par rapport aux habitats naturels.

Une autre spécificité des habitats artificiels est qu'à l'échelle régionale, les communautés d'espèces pourraient être plus homogènes qu'elles ne le sont en milieu naturel du fait de l'importance du trafic maritime commercial ou récréatif (Bishop et al. 2015). Ces vecteurs s'ajoutent en effet à la dispersion naturelle dans l'établissement des patrons de connectivité des populations. C'est ce qui est suggéré par la rapide expansion de l'ascidie solitaire *Asterocarpa humilis* en l'espace de 3 années dans les ports de plaisance anglais et bretons de la Manche Occidentale (Figure 1.1).

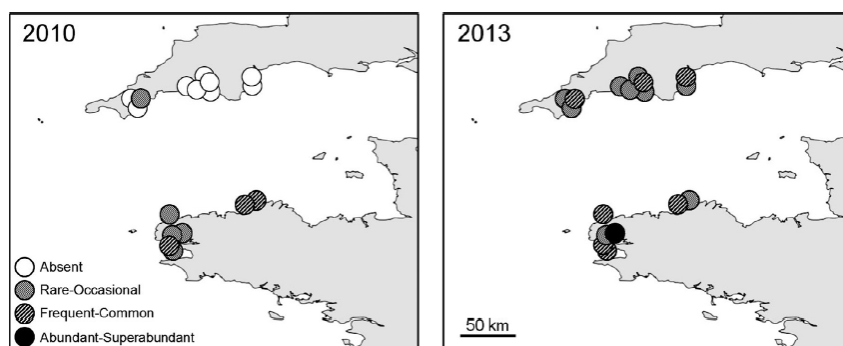


Figure 1.1. **Présence et abondance** (échelle semi-quantitative) **de l'ascidie non indigène *Asterocarpa humilis*** dans des ports de plaisance de la Manche occidentale. Ces données ont été obtenues dans le cadre de RAS réalisés en 2010 et 2013. Figure tirée de Bishop et al. (2015).

La classe des ascidies est particulièrement bien représentée parmi les espèces non-indigènes de ces communautés, et ce à une échelle mondiale (Lambert & Lambert 1998; Shenkar & Swalla 2011; Bishop et al. 2015). Dans le cas de la Manche occidentale, les inventaires réalisés par Arenas et al. (2006) le montre également (voir Figure 1.2 où la classe des ascidies est répertoriée dans l'embranchement des chordés). Les ascidies représentent une part importante de la biomasse et jouent un rôle important dans la structure du réseau trophique des écosystèmes portuaires (Lambert & Lambert 1998, 2003). De ce fait, il s'agit des taxons les plus étudiés dans ces habitats, en écologie des communautés (Lindeyer & Gittenberger 2011; Rius et al. 2014a; Tracy & Reynolds 2014; Lopez-Legentil et al. 2015; Airolidi et al. 2015), pour ne citer que quelques exemples récents)), comme en génétique des populations (e.g. Dupont et al. 2007; Dupont et al. 2009; Lejeune et al. 2011; Perez-Portela et al. 2012; Perez-Portela et al. 2013).

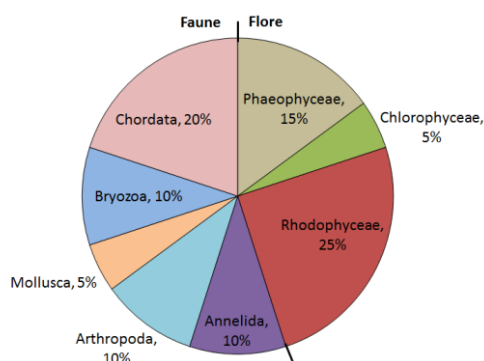


Figure 1.2. **Distribution de la proportion des 20 espèces introduites répertoriées par groupe taxonomique**, dans les sites étudiés en Manche par Arenas et al. (2006).

Les deux espèces de ciones, *Ciona intestinalis* (espèce indigène de l'Atlantique Nord) et *C. robusta* (espèce non-indigène dans l'Atlantique Nord) font partie intégrante du paysage sous-marin de ces écosystèmes portuaires (Figure 1.3; Lambert & Lambert 1998). Elles sont rapidement identifiables sur le terrain à partir de plusieurs traits morphologiques décrit par Sato *et al.* (2012) et détaillés dans l'encadré 8. Cependant, du fait de leur reconnaissance tardive, les études réalisées jusqu'à présent en écologie des communautés n'ont pas fait la distinction entre les deux espèces et notamment dans la zone de sympatrie. Par exemple, dans le cas de l'étude d'Arenas *et al.* (2006) précédemment décrite, la présence du taxon *C. intestinalis* est documentée en forte abondance dans les ports suivis, mais est notée comme espèce indigène alors qu'il est probable que *C. robusta* ait été présente également. Plus récemment, l'étude de Bishop *et al.* (2015) documentant la présence d'espèces non-indigènes de faune sessile au cours de RAS réalisés en 2010 et 2013 dans 17 ports de plaisance des côtes anglaises et françaises de la Manche occidentale n'a pas non plus distingué *C. robusta* (ou *C. intestinalis* type A, nom de taxon utilisé il y a encore très récemment) dans la liste des espèces suivies. On notera que dans cette étude, la distinction entre les deux espèces avait été réalisée lors du dernier suivi (en 2013) mais n'a pu pas être prise en compte dans l'étude complète pour permettre la comparaison avec le suivi réalisé en 2010 (F. Viard, communication personnelle).



Figure 1.3. Photographie l'importance des ciones au sein des communautés d'espèces établies sous deux flotteurs adjacents au port de plaisance de Quiberon (Bretagne Sud). © Laurent Lévêque, Station Biologique de Roscoff.

Dans la zone de sympatrie bretonne, les deux espèces *C. intestinalis* et *C. robusta* ont été identifiées dans la majorité des habitats portuaires bretons lors de différents suivis, récoltes ou études réalisés depuis 2010 à la station biologique de Roscoff (Annexe 1.1). La Figure 1.4 intègre les observations réalisées au cours de ma thèse ou lors de travaux antérieurs. Elle rassemble des informations sur la présence des deux espèces obtenues à différentes dates. Si la présence à l'échelle régionale de l'espèce introduite *Ciona robusta* est sans équivoque, les données notamment quantitatives (e.g. abondance relative des deux espèces, densité des populations) manquent pour évaluer l'importance relative de l'espèce non-indigène par rapport à sa congénère indigène. De même, la caractérisation des peuplements dans lesquels sont trouvées l'une et l'autre manquent. Ces données sont pourtant nécessaires pour mieux caractériser les conditions de leur coexistence qui est un préalable à d'éventuelles interactions écologiques ou évolutives entre les deux espèces.



Figure 1.4. **Distribution des espèces *Ciona robusta* (point rouge) et *Ciona intestinalis* (point bleu) le long des côtes bretonnes et atlantiques en France.** Cette carte est une synthèse de points d'observations des deux espèces réalisés au cours de ces dernières années dans différents contextes (qui sont précisés dans l'Annexe 1.1).

L'objectif du travail présenté dans ce chapitre était ainsi de d'obtenir des données permettant de caractériser la présence et abondance de *Ciona intestinalis* et *Ciona robusta* et surtout de décrire les communautés dans lesquelles elles sont établies dans les habitats portuaires bretons. Pour répondre à ces objectifs, différents jeux de données issues de plusieurs études ont été utilisés :

- 1) **Les données d'une expérience visant à étudier la dynamique de colonisation et d'établissement des communautés d'invertébrés sessile, sur des substrats vierges dans les habitats artificiels.** Les résultats que je vais présenter dans ce manuscrit font partie d'une étude plus large, réalisée à l'échelle de la Manche occidentale. Cette étude a été menée en collaboration avec John D.D Bishop de la « Marine Biological Association » de Plymouth dans le cadre du projet Interreg IVa Marinexus. L'objectif initial était de caractériser les communautés de la faune sessile des habitats portuaires et de comparer les patrons de diversité/abondance entre les ports de plaisance situés de part et d'autre de la Manche pour notamment tester l'hypothèse d'une homogénéisation biotique à cette échelle trans-régionale. Cette étude reposait sur une approche expérimentale *in situ* réalisée dans 6 ports bretons et 7 ports anglais entre 2010 et 2013 : des substrats vierges étaient immergés pendant un an puis renouvelés, et cela sur trois années consécutives. Quelques-uns des résultats préliminaires obtenus au cours de cette étude sont présentés dans l'encadré 5. Cette étude devrait faire l'objet d'un article scientifique à cette échelle trans-régionale. Si je n'ai pas conçu cette expérience, j'y ai en revanche participé dès le début de ma thèse, et j'ai acquis les données des séries de substrats relevés en 2012 et 2013. Cette étude m'a permis de me former à la reconnaissance des espèces présentes

dans ces habitats grâce au travail effectué avec J.D.D. Bishop notamment lors d'un séjour passé dans son laboratoire. Concernant plus spécifiquement ma thèse, cette étude m'intéressait pour analyser les communautés existantes en présence de *C. intestinalis* et/ou *C. robusta*. La distinction entre les deux espèces n'a cependant pas été réalisée dans les ports anglais et seulement partiellement dans les ports bretons. J'ai donc ici extrait et travaillé sur les données des ports pour lesquelles la distinction entre les deux espèces avait été faite (Figure 1.5, Tableau 1.1).

2) **Un inventaire *in situ* du peuplement d'ascidie naturellement établi sous les pontons, dans les habitats portuaires en Bretagne** ; l'objectif ici était de s'affranchir de l'utilisation d'un dispositif expérimental tel qu'utilisé précédemment. Cet inventaire a été réalisé en 2014 dans 9 ports bretons (dont 5 communs avec la précédente étude, Figure 1.5, Tableau 1.1). En outre, cette étude menée avec des cadrats permettait d'obtenir des **données de densité des populations de *C. robusta* et *C. intestinalis***. Cette étude a été menée en collaboration avec Laurent Lévêque à la Fédération de Recherche 2424 de la station Biologique de Roscoff et Guillaume Dubois, Ingénieur d'étude contractuel dans l'équipe dont j'ai dirigé le travail pour ces suivis.

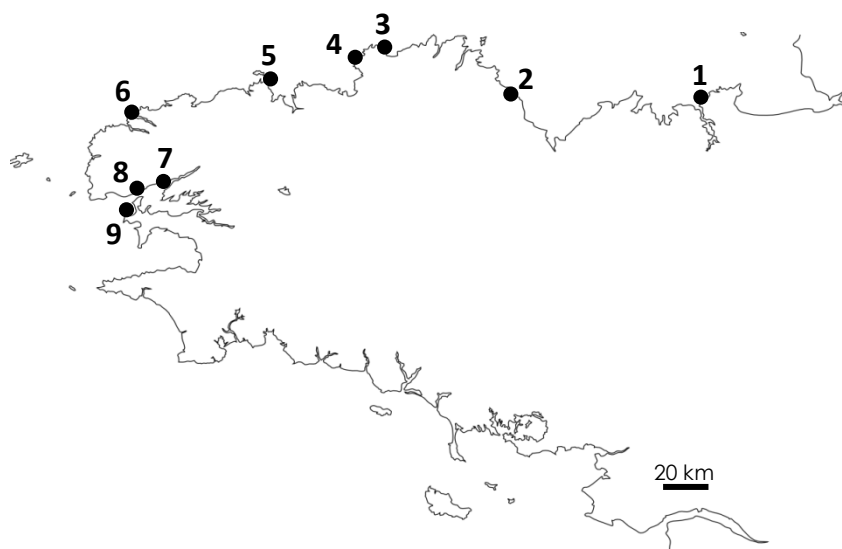


Figure 1.5. **Carte des sites d'étude** (i.e. ports de plaisance) dans lesquels ont été réalisés les études de la dynamique d'établissement de la faune sessile et de la caractérisation des peuplements établis d'ascidies (incluant des données de densité des populations de *C. robusta* et *C. intestinalis*).

Tableau 1.1. **Détails des sites d'étude** présentés dans la Figure 1.5 et des études réalisées au sein des sites.

Num.	Localité	Latitude (N); longitude (O)	Etude 1- Dynamique d'installation à 1 an	Etude 2- Caractérisation du peuplement d'ascidie	Etude 3- Densité <i>C. robusta</i> / <i>C. intestinalis</i>
1	Saint Malo	48.638513 ; -2.026948		Mai et Octobre 2014	Mai et Octobre 2014
2	Saint Quay	48.645833 ; -2.821185			
3	Perros Guirec	48.804850 ; -3.442832	Mars et Aout 2010-11, Mars 2011-12		
4	Trébeurden	48.769507 ; -3.585319			
5	Roscoff	48.718199 ; -3.967686		Octobre 2014	
6	Aber Wrac'h	48.598002 ; -4.562338	Mars et Aout 2010-11, Mars 2011-12	Mai et Octobre 2014	
7	Moulin Blanc	48.389981 ; -4.433428			
8	Château	48.380329 ; -4.489958			
9	Camaret	48.279401 ; -4.597736			

Encadré 5. Etude de la dynamique d'établissement des communautés de faune sessile à l'échelle de la Manche Occidentale : quelques résultats préliminaires...

Dans le cadre du projet Interreg IVa Marinexus, plusieurs études concernant les espèces non-indigènes des habitats portuaires ont été réalisées conjointement entre la Station Biologique de Roscoff et la Marine Biological Association of United Kingdom à Plymouth, études coordonnées par J. Bishop & F. Viard. Outre des études de génétique des populations et des inventaires visant à comparer la composition en espèces non-indigènes des deux côtés de la Manche, (e.g. Bishop *et al.* 2015), un des objectifs était de caractériser les communautés de faune sessile d'espèces indigènes et non-indigènes. L'approche utilisée est une étude expérimentale *in situ* afin d'analyser les communautés établies après une période d'un an. Pour cela, des substrats vierges (des plaques de sédentarisation) ont été immergés simultanément (même mois) dans 6 ports de plaisance en Bretagne et 7 dans le Sud de l'Angleterre (Devon & Cornouailles) et relevés au bout d'un an pour être analysés au laboratoire. Les immersions de substrats vierges ont été répétées au printemps et en automne, sur 3 années consécutives (2010-2011, 2011-2012, 2012-2013). Le protocole utilisé est décrit dans la section 2.1 de ce chapitre. Les résultats préliminaires présentés ci-dessous correspondent aux traitements des données acquises au printemps pour les trois années consécutives.

En considérant conjointement les espèces indigènes et non indigènes, une distinction entre les communautés de faune sessile des ports bretons et anglais est observée au cours des trois années (Figure E5.1). Cette séparation s'explique en partie par certaines espèces indigènes proches de la limite nord de leur aire de distribution en Manche occidentale, telles que l'ascidie solitaire *Phallusia mammillata*, fréquente en Bretagne et quasiment absente dans le sud de l'Angleterre. Par ailleurs, une part importante de la distinction entre les deux côtés de la Manche est attribuée à une plus forte abondance d'espèces non-indigènes en Bretagne (reflétant les résultats obtenus par ailleurs avec des inventaires *in situ* ; Bishop *et al.* 2015), dont les principales sont les bryozoaires *Bugula neritina*, *Tricellaria inopinata* et *Watersipora subtorquata* et les ascidies solitaires *Corella eumyota* et *Asterocarpa humilis*.

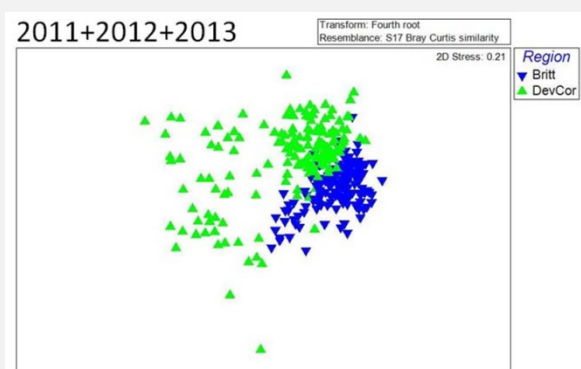


Figure E5.1. Représentation multidimensionnelle non métrique (i.e. « Non-metric multidimensional scaling », nMDS) basée sur une matrice de similarité de Bray-Curtis entre communautés de faune sessile, illustrées pour les ports de plaisance bretons (en bleu) et du sud de l'Angleterre (en vert) pour les substrats vierges (plaques) immergés au printemps de chacune des trois années 2010, 2011 et 2012 et relevées au printemps 2011, 2012 et 2013. Chaque point représente une plaque.

Des différences de communauté d'espèces ont également été mises en évidence entre les ports de plaisance sur chacune des côtes de la Manche, suggérant que les caractéristiques locales (e.g. configuration du bassin des ports, localisation proche d'embouchure de rivières, etc.) pourraient influencer la nature des communautés qui s'y développent. Par exemple, on note que les communautés de faune sessile de Plymouth (Sutt, QABa et PIYH en figure E5.2 à droite) subissent d'importants changements d'une année à l'autre, qui pourraient traduire l'influence des arrivées ponctuelles et massives d'eau douce du fleuve Tamar.

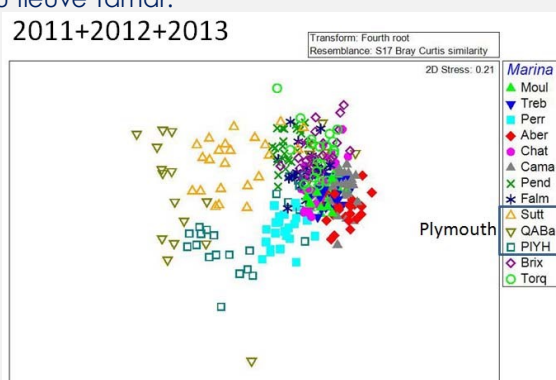
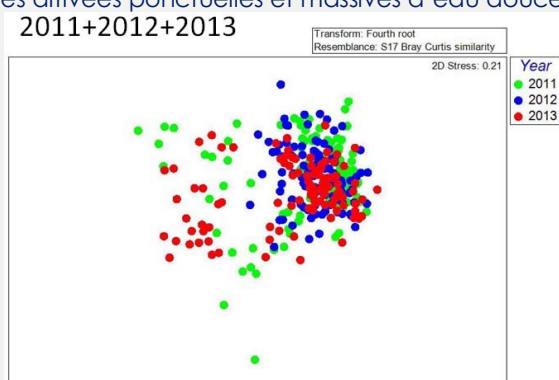


Figure E5.2. nMDS (même analyse que la figure E5) distinguant les plaques en fonction de l'année de récupération (à gauche) et en fonction des ports de plaisance suivis (à droite).

II. Méthodes expérimentales et analyses des données

2.1. Dynamique d'établissement des communautés de faune sessile dans les habitats portuaires bretons

2.1.1. Mise en place de l'expérimentation et recueil des données

La dynamique d'établissement des communautés de la faune sessile dans les habitats portuaires a été réalisée dans six ports de plaisance bretons (Figure 1.5) à partir d'inventaires d'espèces réalisés sur des substrats vierges immergés pendant un an. A partir des résultats d'expériences de même nature, menées dans le laboratoire de John D.D. Bishop, les substrats choisis ont été des plaques de Correx (polyéthylène alvéolé) de couleur noire, suspendues verticalement par une corde à 1.5 m lestée par un poids sous un ponton (Figure 1.6.A). Ces dispositifs, classiquement utilisés dans ce type d'habitat pour analyser les communautés d'espèces (e.g. Lindeyer & Gittenberger 2011; Tracy & Reyns 2014), offrent un substrat favorable à la sédentarisation et au développement des communautés d'invertébrés sessiles et d'espèces algales (Figure 1.6.B).

Dans chacun des 6 ports bretons, huit plaques ont été installées, avec l'aide de l'équipe plongée du service Mer & Observation de la Station Biologique de Roscoff, en mars et en août de l'année n pour observer les effets éventuels des variations saisonnières sur la diversité spécifique. Sur les 8 plaques, 4 ont été installées à l'entrée du port (*i.e.* considérée comme une zone ouverte sur l'extérieur et avec un fort hydrodynamisme) et 4 à l'intérieur du port (*i.e.* considérée comme une zone abritée caractérisée par un faible hydrodynamisme) pour optimiser la possibilité d'étudier des communautés diversifiées dans chacun des ports suivis. Les plaques ont été laissées pendant un an, c'est-à-dire collectées en mars et août de l'année $n+1$.

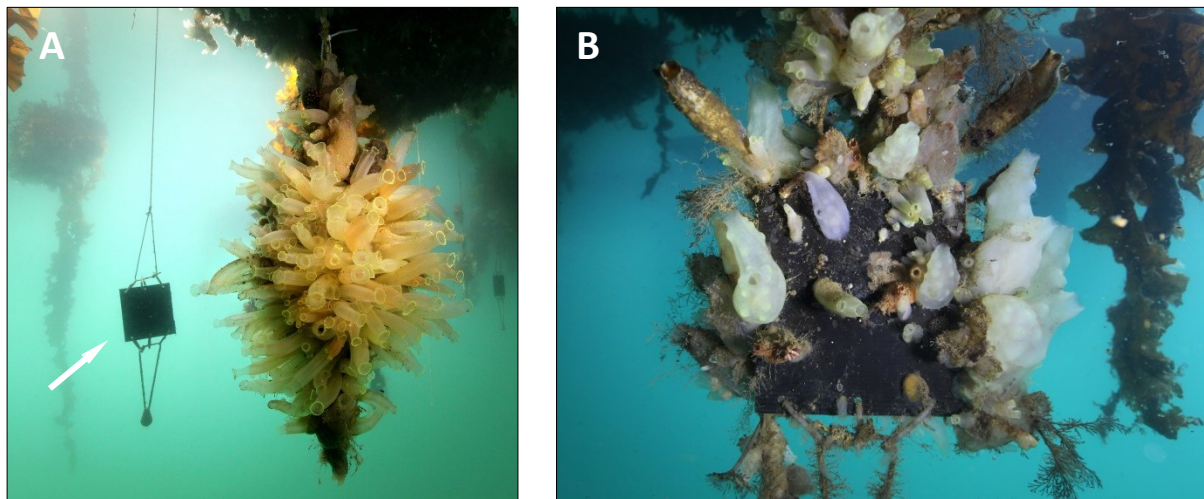


Figure 1.6. (A) **Dispositif utilisé pour caractériser les communautés de faune sessile** dans les habitats portuaires (indiqué par une flèche blanche) adjacent à un dispositif installé depuis 6 mois sur lequel on voit une colonisation particulièrement importante par des cioncs. (B) **Dispositif colonisé par plusieurs espèces d'ascidies et de bryozoaires**, 1 an après son installation en mars 2011 dans le port de plaisance du château (n°8, Figure 1.5). © Wilfried Thomas, Station Biologique de Roscoff.

Au bout d'un an, les plaques ont été récupérées *in situ*, avec l'aide de l'équipe plongée de Roscoff. L'utilisation de la plongée a permis d'installer les dispositifs directement sous les pontons (limitant ainsi les pertes) mais également lors du retrait des plaques de les placer immédiatement dans des filets à maille de 1 mm afin d'empêcher la perte d'organismes lors de leur remontée et transport (Figure 1.7). Les plaques ont été ramenées au laboratoire dans de

grands bacs contenant de l'eau prélevée localement. A leur arrivée, les plaques ont été conservées dans des aquariums en eau courante et préalablement à l'identification des espèces, elles ont été placées de 20 à 30 minutes dans une solution de phénoxy-2-propanol (diluée à 1/1000^e) pour anesthésier et faciliter l'identification des individus (*i.e.* principalement pour les ascidies solitaires, les individus se contractant lorsqu'ils subissent un stress), puis placées 10 minutes dans de l'éthanol à 80%.



Figure 1.7. **Relevé en plongée des substrats un an après leur immersion sous les pontons.** Des filets en « tissu moustiquaire » sont utilisés pour empêcher la perte de spécimens au cours de leur émergence et transport. © Yan Fontana, Station Biologique de Roscoff.

Pour chacune des plaques, des données quantitatives de l'abondance des espèces de la faune sessile ont été obtenues, sur les deux faces verticales, à l'aide d'une grille composée de 100 points, placée sur la plaque collectée (Figure 1.8). Les spécimens présents sous chacun des points, *i.e.* les individus directement observés et les individus présents dans les sous-strates sous ce point, ont été identifiés si possible jusqu'à l'espèce. En utilisant cette stratégie de comptage, on peut obtenir une valeur d'abondance par plaque largement supérieure à 200 points du fait de structure stratifiée de la communauté sédentarisée. Une liste non exhaustive d'espèces (Annexe 1.2) avait été préalablement réalisée pour aider à la collecte des données, et les nouvelles espèces observées ont été ajoutées au fur et à mesure. A l'issue de ces identifications, les espèces ont été classées dans trois catégories : espèces indigènes, non-indigènes ou cryptogéniques (voir Annexe 1.3 pour des informations concernant cette classification pour les taxons identifiés au niveau spécifique). J'ai réalisé les déterminations avec l'aide de John D.D. Bishop, présent à Roscoff à chaque période de relevés des plaques.



Figure 1.8. **Photographie du dispositif de collecte des données : une grille composée de 100 points (*i.e.* 100 intersections) est installée sur une plaque colonisée.** Cette plaque a été collectée au port du château (Brest) en mars 2013. © John D.D. Bishop, Marine Biological Association.

Cette expérience a débuté en mars 2010 avant le démarrage de ma thèse et s'est achevée en mars 2013. Les séries de données ont été acquises pour les dispositifs de recrutement récupérés en mars 2011, mars 2012 et mars 2013 pour les plaques immergées au printemps et en

août 2011 et août 2012 pour les plaques immergées en fin d'été. Cependant pour les suivis correspondant aux données récoltées en mars 2011 et août 2011 ainsi que pour la moitié des plaques récupérées lors des autres dates de collectes, la distinction entre *C. intestinalis* et *C. robusta* n'a pas été réalisée. Le jeu de données analysé dans ce chapitre correspond donc à 4 plaques pour chaque port (2 internes et 2 externes) qui ont été récupérées en mars 2012, août 2012 et mars 2013.

2.1.2. Analyses des données

a- Analyse de la diversité spécifique locale et de la composition des communautés d'espèces en fonction de leur statut (i.e. indigène, non-indigène et cryptogénique)

Les effectifs des taxons ont été obtenus pour l'ensemble des 4 plaques étudiées par port et période expérimentale (correspondant à la date de récupération des dispositifs après un an soit mars 2012, août 2012 et mars 2013). Des analyses de diversité spécifique locale (i.e. diversité α) ont été réalisées pour les taxons identifiés au niveau spécifique (Annexe 1.4) en calculant plusieurs indices complémentaires tels que la richesse spécifique (S), l'indice de diversité de Shannon-Wiener (H'), l'indice de diversité de Simpson (λ') et l'indice d'équitabilité de Pielou (J'), présentés dans l'encadré 6. La combinaison de ces différents indices donne une image synthétique de la diversité spécifique au sein d'une communauté d'espèces. L'ensemble de ces indices a été calculé avec la procédure DIVERSE du logiciel PRIMER 6+ (Clarke & Warwick 2001).

Afin de comparer la diversité spécifique entre dates et entre sites, une analyse de variance à deux facteurs orthogonaux et fixes (i.e. date et site) a été réalisée pour chacun des indices de diversité. Les données ne remplissant pas les conditions de normalité, une analyse de la variance par permutations (i.e. PERMANOVA (Anderson 2001; Anderson *et al.* 2008) ; Encadré 7) basée sur une matrice de distance Euclidienne entre les échantillons (i.e. les plaques) a été réalisée. La routine PERMANOVA, disponible dans le logiciel PRIMER 6+, est généralement utilisée pour des analyses multivariées mais peut être utilisée pour des analyses univariées quand l'hypothèse de normalité nécessaire à l'utilisation d'une ANOVA (analyse de variance) sont rejetées. Cette procédure est plus robuste qu'un test non paramétrique, basé sur les rangs. L'homogénéité de la dispersion des résidus par facteur est testée en utilisant la routine PERMDISP (Anderson *et al.* 2008) basée sur la même matrice de distance Euclidienne, revenant à réaliser un test de Levene. Un total de 9999 permutations aléatoires au sein de la matrice Euclidienne a été réalisé et la matrice observée comparée aux données simulées pour obtenir les valeurs de probabilités associées au test de l'hypothèse d'absence d'effet de la date ou du site sur un indice de diversité donné. Lorsqu'un effet significatif d'un ou plusieurs facteurs a été observé, des tests post-hoc de comparaisons par paires ont été réalisés par permutations.

Sur la base des taxons identifiés jusqu'à l'espèce, la proportion d'espèces non-indigènes par rapport à la totalité des espèces identifiées a été calculée pour chacun des échantillons (i.e. plaques). Afin de comparer cette proportion entre sites et entre dates, une PERMANOVA basée sur une matrice distance Euclidienne entre les échantillons a été réalisée, suivie par des tests de comparaisons par paires. L'homogénéité de la dispersion des résidus par facteur a été vérifiée préalablement à l'analyse (i.e. routine PERMDISP).

b- Analyse de la structure régionale des communautés de faune sessile

En complément de l'analyse de la diversité spécifique locale, l'indice de diversité β correspondant à la différenciation en termes d'espèces identifiées entre les sites a été calculé pour chacune des dates, à l'aide de la formule de Whittaker (1960) :

$$\beta = \frac{\gamma}{\alpha_{moy}}$$

où γ est le nombre d'espèces identifiées dans l'ensemble des ports à une date donnée, et α_{moy} , la moyenne du nombre de taxons identifiés par site pour la même date. Cette valeur est égale à 1

lorsque toutes les espèces sont partagées entre les sites et égale à γ lorsqu'aucune espèce n'est partagée entre sites.

L'analyse des données d'abondance a ensuite été réalisée sur la totalité des taxons identifiés (espèces, genre ou famille) à partir d'une matrice composée de n échantillons (*i.e.* plaques) et x taxons. Pour donner moins de « poids » aux taxons très abondants dans le jeu de données et remplir les conditions d'homogénéité de la dispersion des résidus par facteur (*i.e.* routine PERMDISP), les données ont été transformées en utilisant la fonction racine quadratique. Nous avons cherché à tester si la faune sessile était similaire quelques soient les dates et les sites (considérés comme des facteurs orthogonaux et fixes), en utilisant une PERMANOVA basée sur une matrice de ressemblance calculée avec la distance de Bray-Curtis. Les résultats sont représentés graphiquement à l'aide d'une Analyse en COordonnées Principales (« Principal Coordinates Analysis » ou PCoA, également appelée MDS métrique, Gower 1966). Le but de la PCoA est de rechercher les axes principaux qui maximisent la variance dans la matrice de ressemblance et de situer les échantillons (ici, les plaques) dans un espace de dimension réduit qui préserve autant que possible les relations de ressemblance entre les échantillons.

Encadré 6. Présentation de différents indices utilisés pour décrire la diversité spécifique

- La **richesse spécifique (S)** mesure le nombre d'espèces identifiées par plaque.

- L'indice de **diversité de Shannon-Wiener (H')** basé sur l'information exprime la diversité d'un peuplement en prenant en compte la richesse spécifique (S) et l'abondance relative des espèces identifiées (*i.e.* équitabilité). Il est calculé de la façon suivante :

$$H' = - \sum_{i=1}^{i=S} p_i (\log_2 p_i)$$

où p_i est la proportion relative de l'espèce i et S le nombre d'espèces identifiées par plaque. L'indice H' augmente avec le nombre d'espèces et l'équitabilité. Il a une valeur proche de 0 lorsque très peu d'espèces sont présentes dans l'échantillon et que l'une d'entre elle est en forte abondance ; il a une valeur maximale lorsque toutes les espèces ont la même abondance relative pour une richesse spécifique donnée.

- L'indice d'**équitabilité de Pielou (J')**, couramment associé à celui de l'indice de Shannon-Wiener, fournit une mesure de la diversité indépendante de la richesse spécifique, et est exprimé de la façon suivante :

$$J' = \frac{H'}{H'_{max}}$$

où $H'_{max} = \log_2 S$ avec S le nombre d'espèces identifiées dans un échantillon. Cet indice varie entre 0, lorsqu'une seule espèce est présente dans l'échantillon, et 1, lorsque les espèces sont réparties de manière équilibrée.

- L'indice de **diversité de Simpson (λ')** fournit une mesure de fréquence également dépendante de la richesse spécifique et de l'équitabilité. Son calcul est basé sur la probabilité que deux individus pris au hasard dans un échantillon appartiennent à la même espèce. L'équation retenue est :

$$1 - \lambda' = 1 - \sum \frac{n_i (n_i - 1)}{N(N - 1)}$$

où n_i est le nombre d'individus de l'espèce i et N , le nombre total d'individus. Cet indice varie entre 0, pour une diversité minimale pour laquelle une espèce donnée est en forte abondance, et 1, pour une diversité maximale et équilibrée entre espèces. Cet indice de diversité est à l'inverse de l'indice de Shannon-Weiner sensible à la présence d'espèces en fortes abondances.

Encadré 7. Description de l'analyse de variance par permutations : la PERMANOVA (Anderson 2001, Anderson et al. 2008)

Prenons un cas simple où l'on souhaite tester l'effet d'un facteur « groupe » sur la variation observée au sein d'un jeu de données. À partir d'une matrice de ressemblance ou de dissemblance, la routine PERMANOVA démarre par une analyse de variance classique, c'est-à-dire partitionne la variance observée sur l'ensemble du jeu de données (*i.e.* la variance totale SS_T , Figure E7.1) en une composante de la variance observée entre les échantillons au sein de chacun des groupes (*i.e.* la variance résiduelle SS_{Res} , Figure E7.1) et en une composante de la variance observée entre les échantillons de différents groupes (SS_A) c'est-à-dire la variance due à l'effet du facteur que l'on souhaite tester. Cette dernière se calcule en faisant la différence entre la variance totale et résiduelle : $SS_A = SS_T - SS_{Res}$.

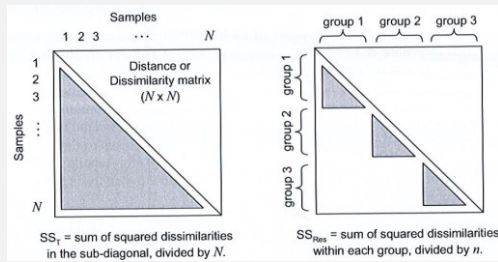
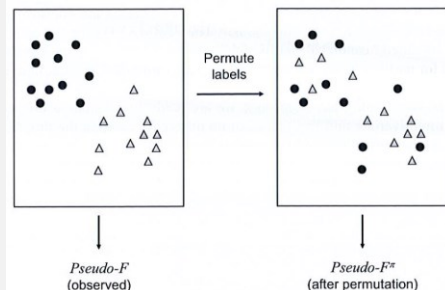


Figure E7.1. Calcul de la somme des carrés de la variance observée entre les échantillons à partir d'une matrice de dissemblance, dans la globalité du jeu de données (à gauche) et au sein des groupes (à droite).

Une fois la variance partitionnée, la routine PERMANOVA réalise un test statistique associé à l'hypothèse nulle d'une absence de différence entre les groupes (*i.e.* absence d'effet du facteur groupe sur la variance observée). Cette valeur statistique appelée pseudo-F ratio se calcule avec l'équation (1), où $(a - 1)$ et $(N - a)$ sont les valeurs des degrés de liberté associés respectivement à la variance du facteur « groupe » et à la variance résiduelle.

$$F = \frac{SS_A / (a - 1)}{SS_{Res} / (N - a)} \quad (1)$$

Un test par permutations par du principe qu'en l'absence d'effet d'un facteur, chacun des échantillons aurait pu être groupé avec n'importe quel autre. La valeur de probabilité associée au test statistique est calculée en mélangeant de façon aléatoire les différents échantillons entre les groupes (Figure E9). Le mélange aléatoire est répété un grand nombre de fois et à chaque permutation, une nouvelle valeur statistique (*i.e.* pseudo-F π) est calculée (Figure E7.2).



La probabilité associée au test statistique, sous l'hypothèse nulle d'une absence de différences entre les groupes, est calculée comme la proportion de valeurs de pseudo-F π supérieure ou égale à la valeur de pseudo-F calculée à partir des données observées.

Figure E7.2. Principe du test par permutations décrit par Anderson et al. (2008)

2.2. Caractérisation des peuplements d'ascidies naturellement établis *in situ* et estimation des densités de populations des espèces *Ciona robusta* et *C. intestinalis*

2.2.1. Echantillonnage et identification des espèces

Cette étude des peuplements d'ascidies établis sous les pontons des habitats portuaires a été réalisée dans neuf ports de plaisance bretons (Figure 1.5) à partir d'inventaires quantitatifs réalisés sur le terrain grâce à des échantillonnages utilisant des cadrats de 40 x 25 cm, placés sous les pontons. Ces échantillonnages ont été faits en plongée à l'aide de l'équipe de plongée du service Mer & Observation de la Station Biologique de Roscoff. Dans chacun des ports, les récoltes ont été effectuées sous deux pontons, pour éviter des effets locaux. Dix cadrats espacés de 5 m chacun ont été réalisés par pontons, couvrant ainsi une distance de 50 m (Figure 1.9.A). Les échantillons collectés à la spatule ont été directement triés et identifiés sur le terrain (Figure 1.9.B). Pour faciliter la collecte des données, une liste d'espèce d'ascidie avait été constituée sur la base des résultats des expériences sur plaques (Annexe 1.5). Les ascidies solitaires ont été dénombrées tandis que l'abondance des ascidies coloniales a été estimée sur la base d'une échelle semi-quantitative allant de 0 à 3.

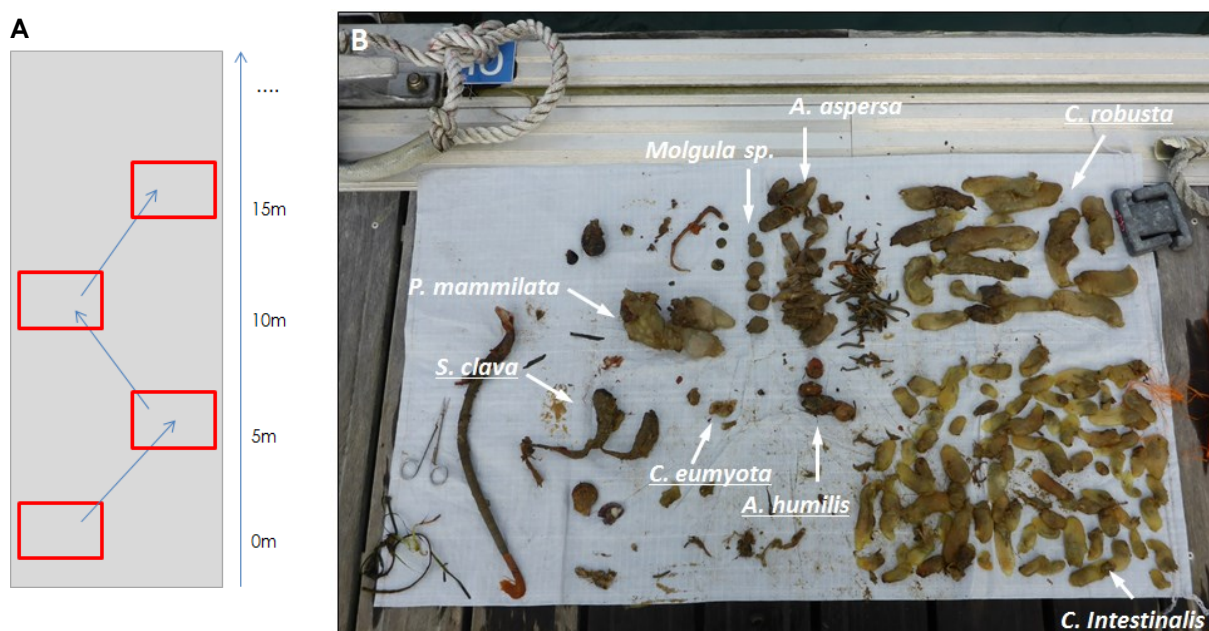


Figure 1.9. (A) **Stratégie de récolte utilisant des cadrats de 40 x 25 cm** répartis en quinconce le long d'un transect de 50 mètres sous un ponton. (B) **Photographie du tri réalisé à partir d'un cadrat récolté** en octobre 2014 au port de Trébeurden. Les différentes espèces d'ascidies identifiées sont indiquées sur la photographie avec leur nom souligné lorsqu'il s'agit d'ascidies non-indigènes. © Frédérique Viard, Station Biologique de Roscoff.

L'utilisation de cadrats a permis en outre d'estimer les densités des populations de *C. robusta* et *C. intestinalis* dans chacun des ports. Les critères d'identification utilisés sont ceux proposés par Sato *et al.* (2012) et présentés dans l'encadré 8. Cette étude a été réalisée en mai et en octobre 2014. Pour le port de plaisance de Roscoff, les données de peuplement n'ont été obtenues qu'en octobre 2014 mais les densités des deux espèces de ciones ont été obtenues aux deux dates.

Encadré 8. Critères utilisés pour l'identification sur le terrain de *Ciona intestinalis* (*C. intestinalis* type B) et *C. robusta* (*C. intestinalis* type A) selon Sato et al. (2012)

Après leur découverte sur la base de critères moléculaires, les deux espèces *Ciona robusta* et *C. intestinalis* (appelées alors respectivement *C. intestinalis* type A et *C. intestinalis* type B) ont d'abord été considérées comme des espèces cryptiques (i.e. non identifiable morphologiquement). Cependant, une étude approfondie de la morphologie interne et externe des deux espèces réalisée par Sato et al. (2012) a mis en évidence plusieurs critères permettant de distinguer les deux taxons efficacement sur le terrain.

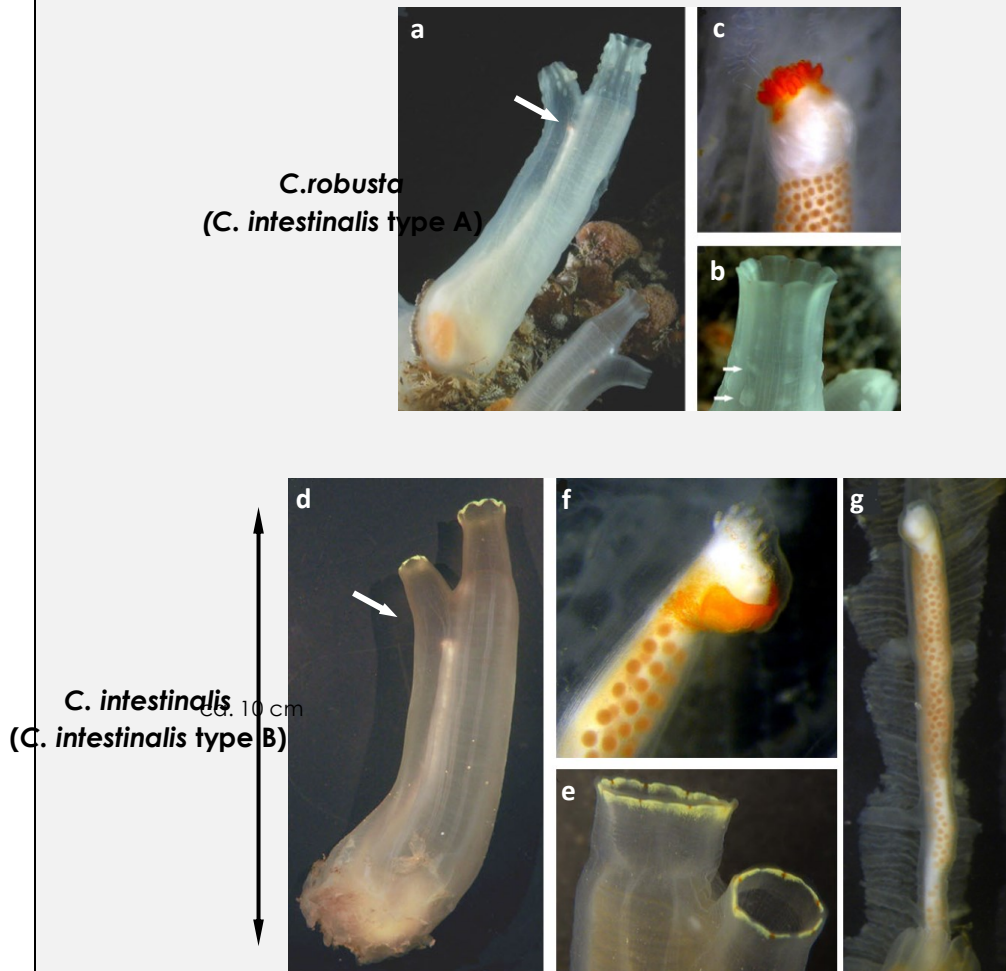


Figure E8. Détails des critères morphologiques distinguant *Ciona robusta* (planche du haut) et *C. intestinalis* (planche du bas). Figures tirées de Sato et al. (2012)

Trois critères ont été identifiés par Sato et al. (2012) permettant l'identification des deux espèces. Ils sont présentés dans la figure E8:

- La couleur de la tunique : la tunique de *C. robusta* est nacrée (Figure E8-a) tandis que celle de *C. intestinalis* est plus transparente (Figure E8-d).
- La coloration des siphons : *C. robusta* possède des tubercules autour des siphons inhalant et exhalant (Figure E8-b) tandis que *C. intestinalis* n'en possède pas. Ce caractère est un des caractères diagnostiques retenus dans le travail d'alpha-taxonomie réalisé par Brunetti et al. (2015) qui a conduit à la proposition d'une nouvelle nomenclature pour les taxons *C. intestinalis* type A et *C. intestinalis* type B. *C. intestinalis* présente en outre souvent à l'extrémité des siphons une corolle jaune continue ou discontinue (Figure E8-e).
- La coloration des extrémités du gonoducte et du spermiducte : chez *C. robusta* la papille terminale du spermiducte est rouge et le gonopore par lequel sont expulsés les ovocytes est incolore (Figure E8-c); *a contrario* chez *C. intestinalis*, la papille terminale du spermiducte est incolore et l'extrémité du gonopore est le plus souvent orange (Figure E8-f) mais il peut aussi être incolore (Figure E8-g).

2.2.2. Analyses des données

a- Données au niveau du peuplement

Les indices de la diversité spécifique des peuplements d'ascidies présentés dans l'étude des « plaques » (2.1.2 ; Encadré 6) ont été calculés pour chacun des ports et chacun des échantillonnages. Seuls les taxons identifiés à l'échelle spécifique ont été pris en compte dans les différents calculs. Afin de tester la variabilité de la diversité spécifique des peuplements d'ascidies entre les dates d'échantillonnage et entre les sites, une analyse de variance par permutations (PERMANOVA) à deux facteurs orthogonaux et fixes (i.e. dates d'échantillonnage et sites) a été réalisée pour chacun des indices de diversité calculé, tel que précédemment décrit dans l'analyse de données des communautés de faune sessile. L'indice de diversité β correspondant à la différenciation en termes d'espèces entre les sites a également été calculé pour chacun des échantillonnages.

Comme dans l'étude précédente, les ascidies identifiées jusqu'à l'espèce ont été répertoriées dans plusieurs catégories en fonction de leur statut indigène, non-indigène ou cryptogénique (voir Annexe 1.3 pour plus de détails). La proportion d'espèces non-indigènes a été calculée par cadmat et une PERMANOVA a été utilisée sur une matrice de distance Euclidienne pour tester les effets des facteurs « sites » et « dates d'échantillonnage », suivie de tests post-hoc de comparaisons par paires.

L'analyse des données du peuplement d'ascidies a été réalisée sur la totalité des espèces/genre/famille identifiés. Cependant du fait de la présence de données quantitatives et semi-quantitatives selon les espèces, une transformation du jeu de données a été réalisée au préalable. Les données quantitatives ont été transformées en utilisant la fonction racine quadratique, distribuant les abondances de notre jeu de données entre 0 et 4.01. Les données semi-quantitatives réparties sur une échelle de 0 à 3 ont été ajoutées aux données quantitatives transformées. A partir de ce jeu de données compilées, les peuplements d'ascidies ont été comparés entre les dates de récoltes et entre les ports (facteurs orthogonaux et fixes) en utilisant une PERMANOVA, basée sur une matrice de ressemblance de Bray-Curtis entre les échantillons, avec 9999 permutations. Les résultats sont représentés graphiquement à l'aide d'une Analyse en COordonnées Principales (« Principal Coordinates Analysis » ou PCoA). Le port de Roscoff, pour lequel les données du peuplement d'ascidies n'ont pas été obtenues en mai 2014, n'a pas été pris en compte dans cette analyse.

b- Analyse de la densité des populations de *C. robusta* et *C. intestinalis*

Pour analyser les patrons de distribution de *C. intestinalis* et *C. robusta* en fonction des ports et des dates d'échantillonnage, les données d'abondance des deux espèces ont été extraites du jeu de données initial et transformées en utilisant la fonction logarithmique ($X+1$) pour remplir les conditions d'homogénéité de la dispersion des résidus par facteur. Les différences entre ports et dates de récoltes, pour chacune des deux espèces indépendamment, ont été évaluées en utilisant une analyse de variance par permutations, basée sur une matrice de distance Euclidienne entre les échantillons, suivie le cas échéant par des tests post-hoc de comparaisons par paires. Les données ont été présentées en nombre d'individus par m².

III. Résultats

3.1. Comparaison de la faune sessile établie au bout d'un an entre ports et périodes d'étude

Sur l'ensemble des trois périodes étudiées (i.e. collecte en mars 2012, août 2012 et mars 2013, après une durée d'un an de colonisation), un total de 33 taxons invertébrés sessiles a été dénombré dans les 6 ports étudiés. Leurs abondances par ports et dates de collecte sont détaillées dans l'annexe 1.4. Les taxons identifiés sont majoritairement distribués dans deux embranchements (Figure 1.10) : les chordés (représentés exclusivement par des ascidies coloniales ou solitaires) et les bryozoaires qui correspondent respectivement à 58% et 18% des taxons identifiés. Parmi les 21 taxons identifiés au niveau spécifique, 10 peuvent être considérés comme non-indigènes, 7 comme indigènes et 4 comme cryptogéniques (Annexe 1.3 pour plus d'informations concernant l'assignation de ces espèces à ces différentes catégories). Concernant les deux embranchements majoritaires i.e. les chordés et les bryozoaires, 32% et 50% des espèces identifiées sont respectivement considérés comme des espèces non-indigènes.

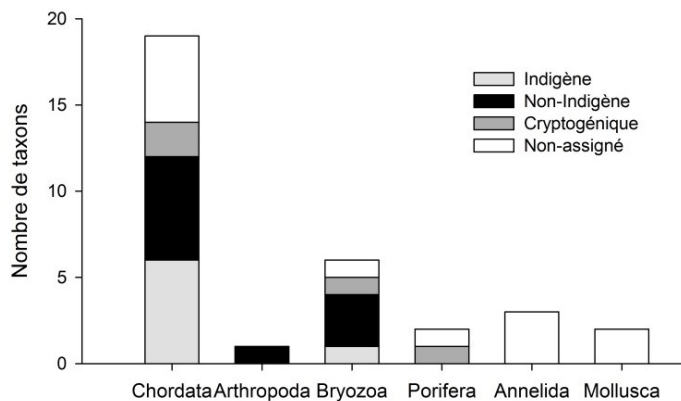


Figure 1.10. Distribution des taxons par embranchement et en fonction de leur statut indigène, non-indigène ou cryptogénique. Les taxons identifiés au niveau du genre ou de la famille n'ont pas été assignés à une catégorie mais sont également présentés dans cette figure.

3.1.1. Variabilité spatio-temporelle de la proportion d'espèces non-indigènes

La comparaison des différents ports, pour une même période, met en évidence des variations de la proportion d'espèces non-indigènes entre les sites (Figure 1.11). Par exemple, sur la période d'établissement d'août 2011 à août 2012, la proportion relative d'espèces non-indigènes varie de 37% (± 3.7 , écart type) au port de l'Aber Wrac'h à 70% (± 8.4) au port de Perros Guirec (Figure 1.11). Ces variations de la proportion d'espèces indigènes sont significatives entre port et entre période d'établissement (Tableau 1.2). Les comparaisons par paires mettent en évidence une contribution importante du port de Perros Guirec pour lequel une dominance d'espèces non-indigènes est observée pour les trois périodes d'établissement, alors que des proportions plus faibles sont généralement observées à l'Aber Wrac'h et Camaret (Figure 1.11).

Source de la variance	df	SS	F	P
Date	2	0.08	9.92	0.003
Port	5	0.49	24.48	<0.001
Date x Port	10	0.05	1.30	0.256
Résidus	54	0.85		

Tableau 1.2. Résultat de l'analyse testant l'effet de des périodes d'établissement et des ports suivis sur la proportion d'espèces non-indigènes. Les valeurs de degrés liberté (df), de la somme des carrés (SS), du pseudo F-ratio (F) et de la probabilité associée au test par permutations (P) sont données. Les résultats des comparaisons par paires sont présentés dans la Figure 1.11.

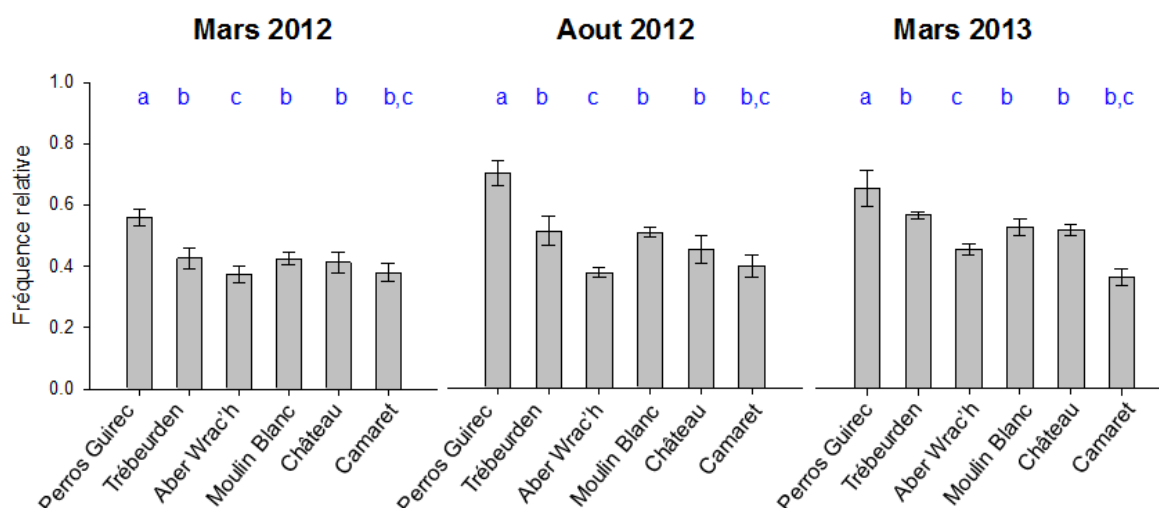


Figure 1.11. **Proportion du nombre d'espèces non-indigènes identifiées** (moyenne \pm erreur standard) dans les 6 ports dans lesquels a été réalisée l'étude et en fonction des trois périodes d'établissement (i.e. collecte en Mars 2012, Aout 2012, Mars 2013). Les résultats des tests de comparaison par paires entre sites (pour chaque période) sont indiqués au-dessus des barres d'histogramme : une même lettre indique une absence de différence significative de la proportion d'espèces non-indigènes entre deux sites ($P > 0.05$).

3.1.2. Variabilité spatio-temporelle des indices de diversité spécifique

La comparaison des indices de diversité, calculés dans les différents ports pour chacune des périodes d'établissement, montrent des variations de la diversité spécifique entre certains ports. En aout 2012, 5 des 6 ports suivis montrent toutefois des valeurs proches allant de 10.0 (\pm 0.82, écart type) au port de l'Aber Wrac'h à 13.3 (\pm 0.96) au port du Château (Figure 1.12). Le dernier port i.e. Perros Guirec, montre en revanche une valeur de diversité spécifique largement plus faible, égale à 5.0 (\pm 1.63). Ces variations entre ports ne sont pas constantes sur l'ensemble des périodes observées (interaction significative, Tableau 1.3). Par exemple, Perros-Guirec montre en mars 2012 des valeurs similaires aux autres localités) et pour cette période aucune différence significative est observée entre les ports (comparaison par paires, Figure 1.12).

Les autres indices fournissent globalement les mêmes informations, et en particulier un effet site significatif (Tableau 1.3). Quelques différences sont toutefois remarquables, par exemple, contrairement à la richesse spécifique, les indices de Shannon, Simpson et Piélou mettent en exergue le cas de l'Aber Wrac'h en mars 2012 qui présente de faibles valeurs par rapport aux autres localités. Or ces trois indices incluent une composante d'équilibre de l'abondance des différents taxons : le résultat à l'Aber est dû à la dominance d'une espèce au sein de la communauté (i.e. l'ascidie solitaire *Phalusia mammillata*, Annexe 1.4).

Sur l'ensemble des indices étudiés, la plupart des variations observées sont dus à un effet « site » mais principalement du fait de deux ports, Perros Guirec et l'Aber Wrac'h.

Tableau 1.3. **Résultats des analyses testant l'effet des périodes d'établissement** (i.e. date de collecte) **et des ports sur chacun des indices de diversité calculés** (S : Richesse Spécifique, H' : Indice de Shannon, 1-λ' : Indice de Simpson, J' : Equitabilité de Pielou). Les valeurs des degrés de liberté (df), de la somme des carrés (SS), du pseudo F-ratio (F) et la valeur de probabilité P calculée par permutations (P) sont données. Les comparaisons par paires sont présentées dans la Figure 1.12.

Source de la variance	df	S			H'			1-λ'			J'		
		SS	F	P	SS	F	P	SS	F	P	SS	F	P
Date	2	3.11	0.51	0.603	0.12	0.36	0.700	0.01	0.74	0.491	0.03	1.09	0.344
Port	5	178.44	11.65	<0.001	1.60	1.99	0.009	0.13	2.83	0.020	0.28	4.99	0.001
Date x Port	10	89.39	2.92	0.006	4.90	3.04	0.004	0.27	2.91	0.004	0.22	1.94	0.056
Résidus	54	165.50			8.69			0.50			0.62		

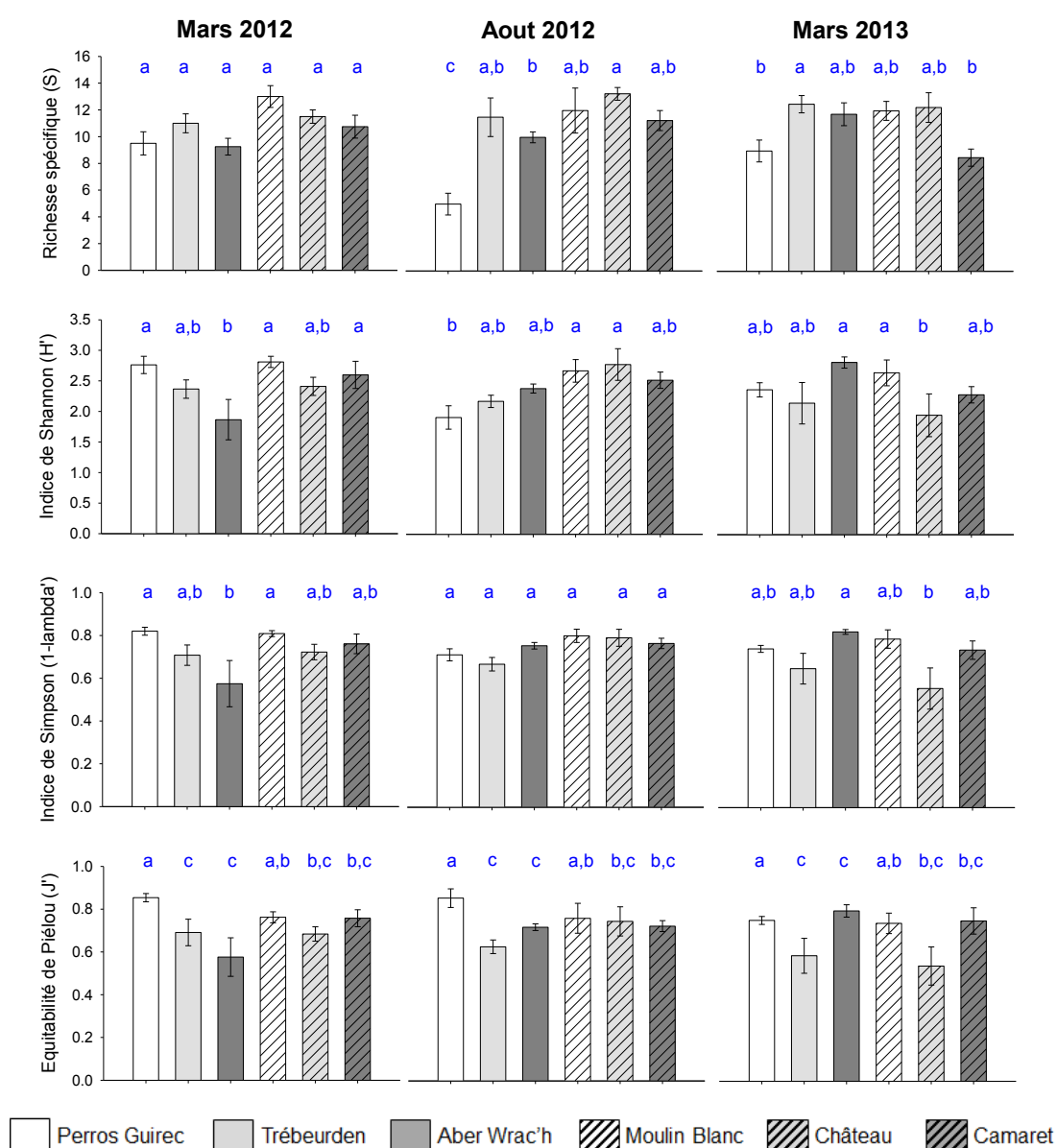


Figure 1.12. **Présentation des indices de diversité** (moyenne ± erreur standard, n=4) **utilisés pour caractériser la diversité spécifique des communautés de faune sessile** dans les 6 ports dans lesquels a été réalisé l'étude et en fonction des trois périodes d'établissement (i.e. collecte en Mars 2012, Aout 2012, Mars 2013). Les résultats des tests de comparaison par paires entre sites (pour chaque période) sont indiqués au-dessus des barres d'histogramme: une même lettre indique une absence de différence significative entre deux sites (P>0.05).

3.1.3. Variabilité spatio-temporelle de la structure régionale des communautés

En terme de présence, la plupart des espèces sont retrouvée dans tous les ports étudiés (Annexe 1.4) comme en atteste les valeurs de diversité β , proches de 1 à chacune des dates : elles sont respectivement égales à 1.295, 1.465 et 1.432 pour les dates de collecte des plaques respectivement de mars 2012, aout 2012 et mars 2013. L'espèce *Ciona intestinalis* est par exemple présente dans tous les ports à toutes les périodes, à l'exception, du port de Perros Guirec en aout 2012. Il existe toutefois des exceptions notables, par exemple l'espèce non-indigène *C. robusta* est rarement présente dans le jeu de données (seulement dans les ports de Trébeurden et Camaret en aout 2012 et Moulin Blanc en mars 2013).

Si la plupart des espèces sont largement présentes sur l'ensemble des sites et périodes, il existe en revanche des variations significatives de l'abondance des taxons sur l'ensemble de la communauté comme le montre le résultat de l'analyse multivariée par permutations (PERMANOVA) présentée dans le Tableau 1.4 : l'abondance des taxons varie significativement entre les périodes et les ports étudiés, et il existe une interaction entre ces deux facteurs.

Source de la variance	df	SS	F	P
Date	2	8084	9.41	0.012
Port	5	45350	21.22	<0.001
Date x Port	10	8999	2.10	0.002
Résidus	54	23085		

Tableau 1.4. **Résultat de l'analyse testant l'effet de des périodes d'établissement et des ports sur l'abondance des différents taxons de la faune sessile.** Les valeurs des degrés de liberté (df), de la somme des carrés (SS), de pseudo F-ratio (F) et de probabilité (P) calculée par permutations sont indiquées.

La représentation graphique de l'analyse en coordonnées principales illustre les principales différences observées, et notamment le fort effet « site » mis en évidence dans la PERMANOVA (Figure 1.13). Sur les deux premiers axes, qui expliquent 51.5% de la variance totale, les données d'abondance des taxons sont bien regroupées en fonction des ports de plaisance (Figure 1.13.C) mais peu par période (Figure 1.13.B). La différence la plus flagrante est celle de la communauté établie au port de Perros Guirec bien séparée des autres le long du premier axe. Deux espèces de bryozoaires, l'une non-indigène *Watersipora subatra* et l'autre cryptogénique *Cryptosula pallasiana*, l'ascidie solitaire non-indigène *Styela clava* et des annélides et éponges non identifiés jusqu'à l'espèce sont les principaux contributeurs à cette différentiation (Figure 1.13.A).

Les autres ports se discriminent principalement entre eux par l'abondance en ascidies solitaires majoritairement indigènes (Annexe 1.4, Figure 1.13.A). Les ascidies indigènes *Phallusia mammillata* et *Clavelina lepadiformis* et l'ascidie non-indigène *Corella eumyota* contribuent en revanche à la différenciation des ports de l'Aber Wrac'h et Camaret, et la forte abondance des ascidies indigènes *Ascidella aspersa* et *Ciona intestinalis* à celle des trois ports restants (i.e. Trébeurden, Château et Moulin Blanc) sur le second axe de l'Analyse en Coordonnées Principales.

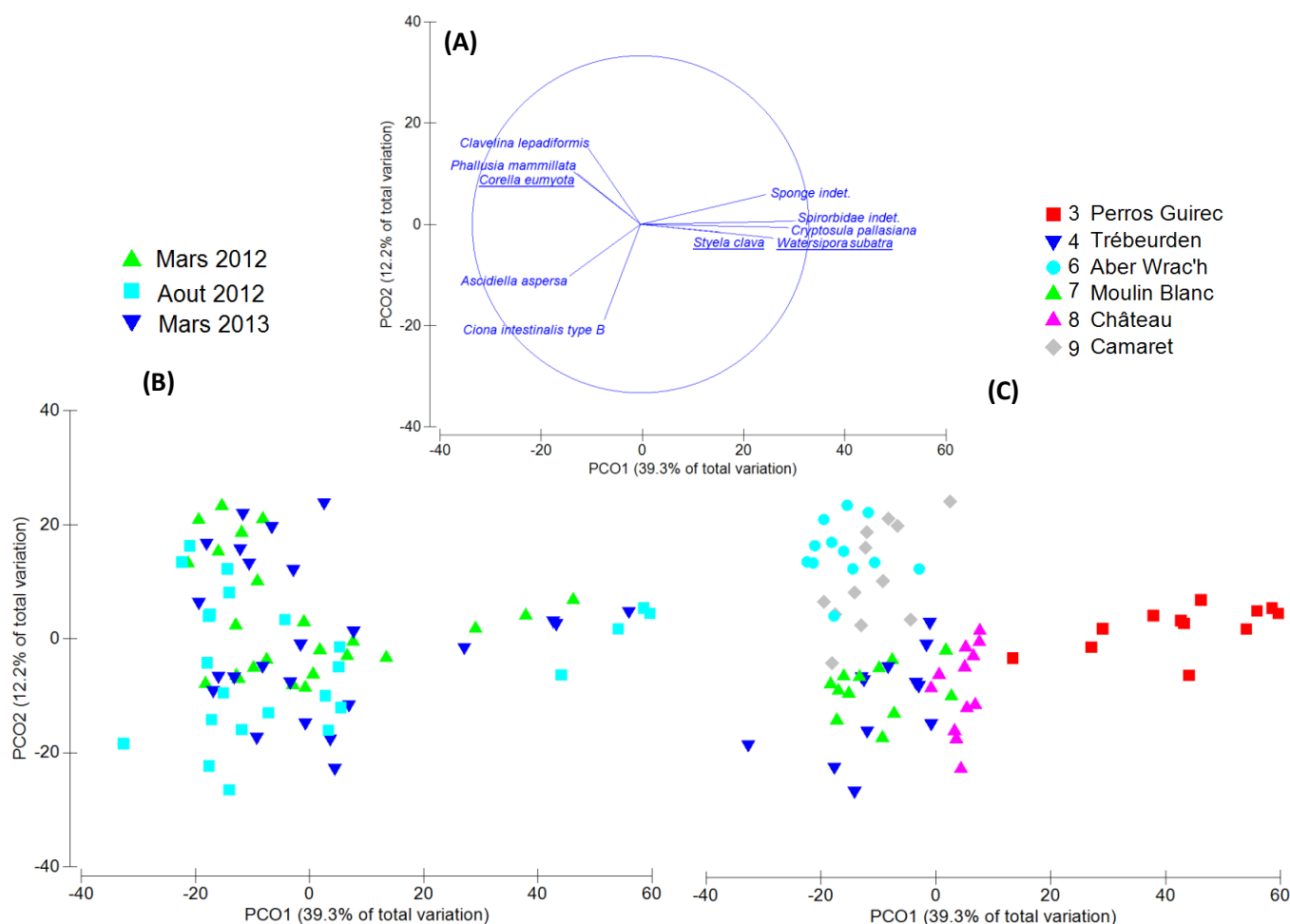


Figure 1.13. **Analyse en coordonnées principales (PCoA) montrant la différenciation des communautés d'espèces de faune sessile en fonction de la date (B) et des ports (C).** Chaque point représente un dispositif. Les vecteurs dans la figure A indiquent les taxons corrélés à plus de 50% à la PCO présentée (coefficient de corrélation de Pearson ≥ 0.5). Les taxons soulignés sont considérés comme non-indigènes. La longueur des vecteurs est fonction de leur corrélation à la PCO présentée. La contribution relative de ces espèces aux deux axes est présentée dans l'annexe 1.6.

3.2. Caractérisation des peuplements d'ascidies établis sous les pontons

Les résultats précédents ont montré l'importance des ascidies au sein des communautés de faune sessile étudiées. Nous avons donc voulu compléter l'étude expérimentale précédente par une analyse des peuplements d'ascidies en place sous les pontons, en étendant l'analyse à 9 ports (trois ports de Bretagne Nord, à Roscoff, Saint-Malo et Saint-Quay ayant été ajoutés). Au cours des deux périodes d'échantillonnage (*i.e.* mai et octobre 2014), les mêmes 19 taxons d'ascidies que dans l'étude des communautés de faune sessile ont été identifiés. Leurs abondances par ports et périodes d'étude sont détaillées dans l'annexe 1.5. Dans ce peuplement, 32% des taxons ont pu être assignés à un statut d'espèce indigène, 32% non-indigène, 10% cryptogénique et enfin 26% des taxons n'ont pas été assignés car ils ne pouvaient pas être identifiés jusqu'à l'espèce sur le terrain. Ces derniers taxons ont en revanche été identifiés au genre ou la famille.

3.2.1. Variabilité spatio-temporelle de la proportion d'espèces non-indigènes

La proportion d'espèces non-indigènes varie significativement entre les ports (Tableau 1.5). Ces différences entre sites sont expliquées par la plus forte proportion d'ascidies non-indigènes dans plusieurs ports : *i.e.* Perros Guirec, Trébeurden et l'Aber Wrac'h en mai 2014 (Figure

1.14) et Perros Guirec, Trébeurden et Camaret en Octobre 2014. Il n'y a en revanche pas d'effets de la date d'échantillonnage sur la proportion d'ascidies non-indigènes.

Source de la variance	df	SS	F	P
Date	1	0.26	0.59	0.535
Port	7	3.38	10.93	<0.001
Date x Port	7	0.62	2.01	0.020
Résidus	305	6.03		

Tableau 1.5. **Résultat de l'analyse testant l'effet de la date d'échantillonnage et des ports sur la proportion d'espèces non-indigènes.** Les valeurs des degrés de liberté (df), de la somme des carrés (SS), de pseudo F-ratio (F) et de la probabilité (P) associée au test par permutations sont indiquées la Figure 1.14.

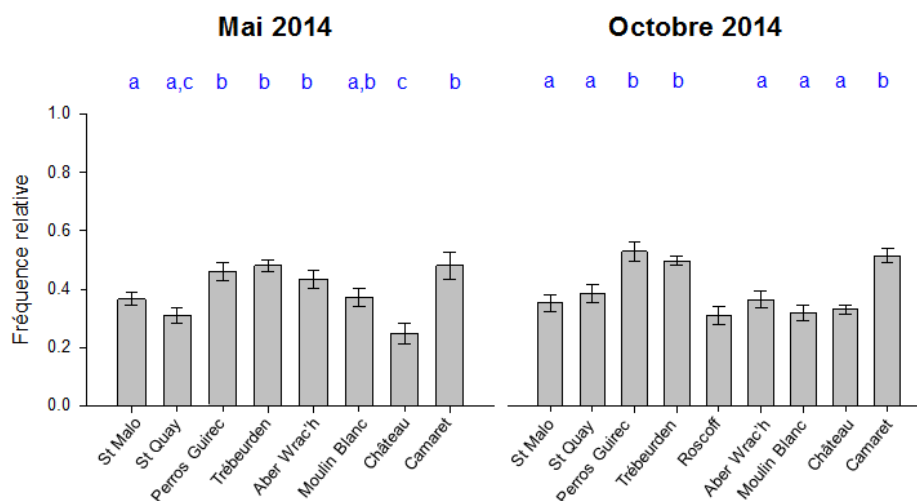


Figure 1.14. **Proportion relative du nombre d'ascidies non-indigènes identifiées** (moyenne \pm erreur standard) dans les 9 ports au sein desquels a été réalisée l'étude en Mai et Octobre 2014. Les résultats des tests de comparaison par paires entre sites (pour chaque date) sont indiqués au-dessus des barres d'histogramme : une même lettre indique une absence de différence significative entre sites ($P > 0.05$). Du fait de l'absence de données en mai 2014, le port de Roscoff n'a pas été pris en compte dans l'analyse.

3.2.2. Variabilité spatio-temporelle des indices de diversité spécifique

Les valeurs des différents indices de diversité varient significativement entre les sites et les périodes d'échantillonnages avec une plus large contribution de l'effet temporel (Tableau 1.6) par rapport à l'étude précédente des communautés de faune sessile. En mai 2014, les valeurs de richesse spécifique d'ascidies sous les pontons calculées à partir des 14 espèces identifiées varient d'en moyenne $4.8 (\pm 1.42, \text{écart-type})$ au port de l'Aber Wrac'h (Figure 1.15) à $9.6 (\pm 2.82)$ au port de St Malo (Figure 1.15). En octobre 2014, exceptée pour les ports de St Malo et Perros Guirec, les valeurs de richesse spécifique d'ascidies augmentent fortement par rapport à la date de collecte précédente (Figure 1.15) avec par exemple, 4 nouvelles espèces observées à l'Aber Wrac'h et 3 au port du Moulin Blanc. Entre sites, les différences sont majoritairement dues aux plus faibles valeurs de richesse spécifique observées à Perros Guirec, à l'Aber Wrac'h et dans les deux ports de la Baie de Brest (i.e. Moulin Blanc et Château) en mai 2014. Les variations entre périodes d'échantillonnage ne sont pas retrouvées avec les indices de Simpson et de Pielou. En revanche, les effets significatifs des sites et la présence d'interaction entre sites et dates sont retrouvés pour tous les indices de diversité étudiés (Tableau 1.6, Figure 1.15).

Tableau 1.6. **Résultats des analyses testant l'effet de la date d'échantillonnage et des ports suivis sur chacun des indices de diversité calculés** (S : Richesse Spécifique, H' : Indice de Shannon, 1- λ' : Indice de Simpson, J' : Equitabilité de Pielou). Les valeurs de degrés liberté (df), de la somme des carrés (SS), de Pseudo F-ratio (F) et de la P-value calculée par permutations (P). Les comparaisons par paires sont présentées dans la Figure 1.15.

Source de la variance	df	S			H'			1- λ'			J'		
		SS	F	P	SS	F	P	SS	F	P	SS	F	P
Date	1	81.82	36.44	<0.001	6.44	41.91	<0.001	0.01	1.49	0.111	0.07	1.52	0.251
Port	7	224.23	14.26	<0.001	19.38	15.76	<0.001	0.31	24.18	<0.001	0.19	2.79	0.047
Date x Port	7	188.97	12.02	<0.001	15.61	14.52	<0.001	0.46	14.15	0.020	0.49	6.10	0.018
Résidus	305	688.35			48.24			0.86			0.69		

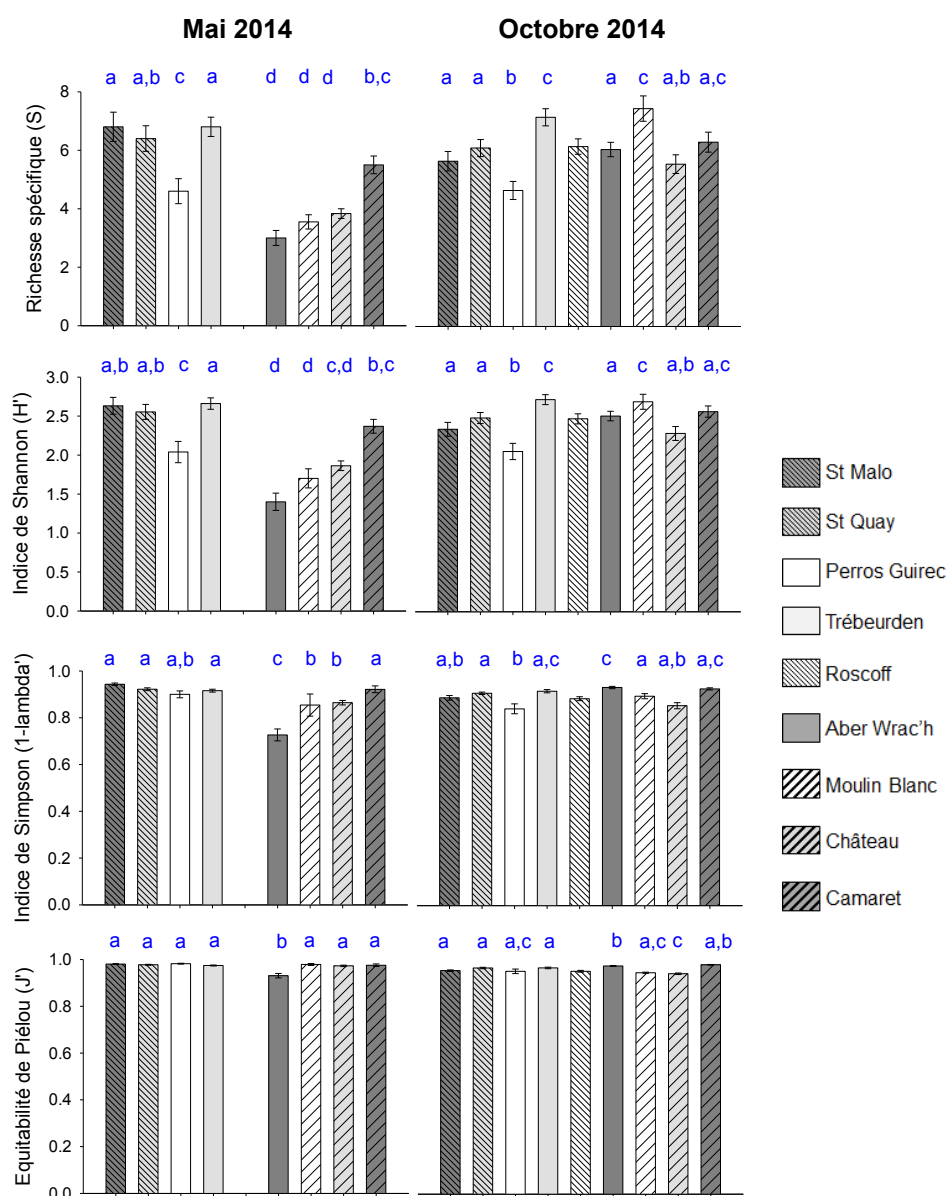


Figure 1.15. **Présentation des indices de diversité** (moyenne \pm erreur standard, n = 20) **utilisés pour caractériser la diversité spécifique des peuplements d'ascidies** dans les 9 ports dans lesquels a été réalisé l'étude en Mai et Octobre 2014. Les résultats des tests de comparaison par paires entre sites (pour chaque date d'échantillonnage) sont indiqués au-dessus des barres d'histogramme: une même lettre indique une absence de différence significative entre deux sites ($P > 0.05$).

3.2.2. Variabilité spatio-temporelle de la structure régionale des peuplements d'ascidies

Comme dans le cas de l'étude précédente, la majorité des espèces d'ascidies sont retrouvées dans tous les ports étudiés comme en atteste les valeurs de diversité β de 1.351 et 1.191 pour les dates d'échantillonnage respectives de mai et octobre 2014.

Les résultats de l'analyse PERMANOVA montrent que l'abondance de ces taxons varie significativement entre les dates d'échantillonnage et les ports, avec des interactions significatives entre ces deux facteurs (Tableau 1.7). Les résultats de l'Analyse en COordonnées Principales (PCoA) illustrent ces interactions. Les échantillons de mai et octobre 2014 sont bien différenciés sur le premier axe pour certains ports (par exemple au port du Moulin Blanc et de l'Aber Wrac'h ; Figure 1.16.B et 2.16.C). La différence entre dates est notamment due à la faible abondance voire l'absence (au port de l'Aber Wrac'h) des ascidies solitaires *C. intestinalis* et *Ascidella aspersa* en mai (Figure 1.16.A, Annexe 1.5). Le second axe différencie principalement les peuplements d'ascidies du port de Perros Guirec et du port de Moulin Blanc (uniquement en mai 2014) des autres ports ou dates. Il est important de noter que la différenciation du port de Perros Guirec est surtout expliquée par une forte abondance de l'espèce non-indigène *C. robusta* (Figure 1.16.A, Annexe 1.5). On remarquera également avec cette analyse que les deux *Ciona* sp. ont une position assez proche dans ce jeu de données et avec des valeurs de contribution similaires à la PCoA présentée, respectivement de 14.15% et 16.13% pour *C. robusta* et *C. intestinalis* (Annexe 1.7).

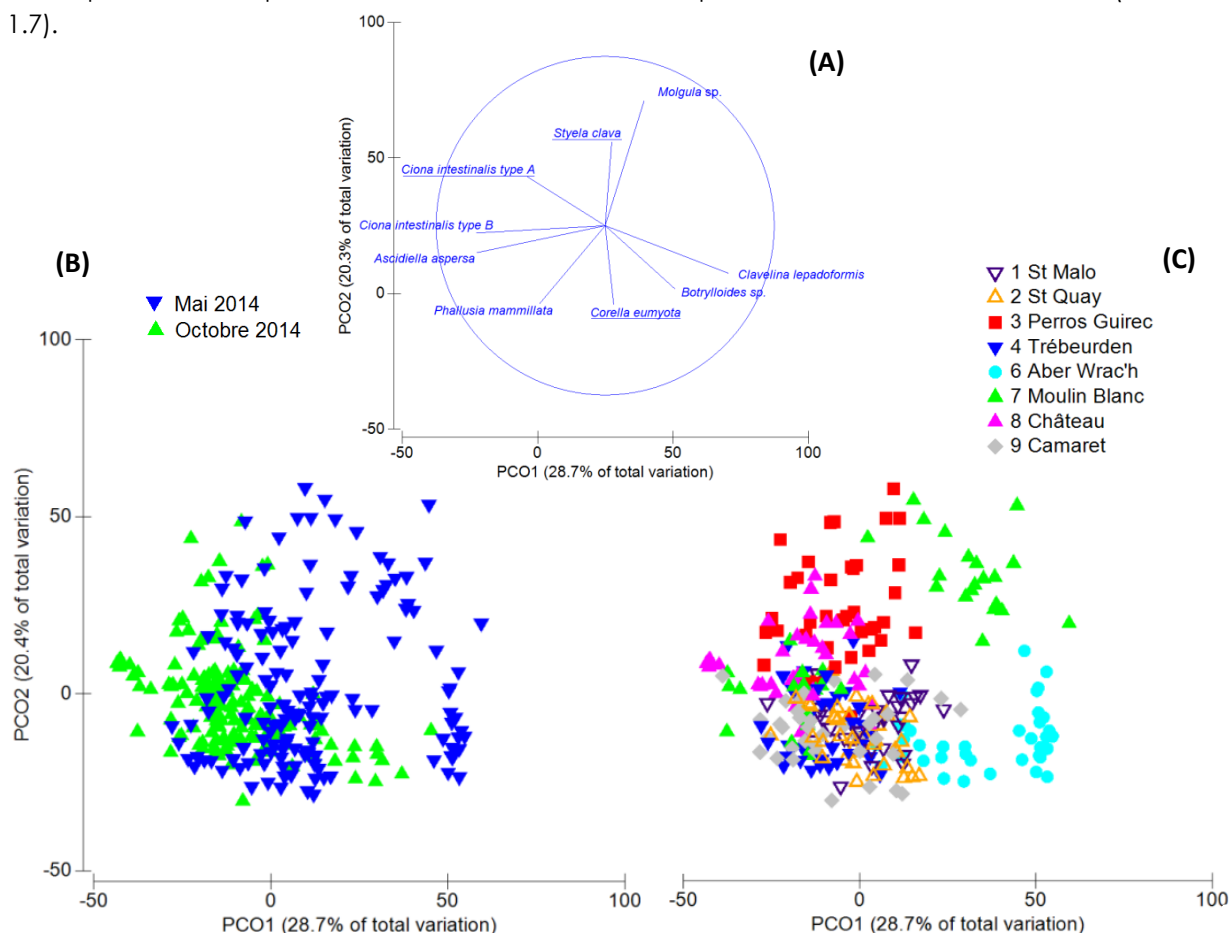


Figure 1.16. Analyse des coordonnées principales (PCoA) montrant la différenciation des peuplements d'ascidies (A) en fonction de la date d'échantillonnage (B) et des ports (C). Chaque point représente les données d'un cadrat. Les vecteurs (figure A) indiquent les taxons corrélés à plus de 50% aux axes (coefficient de corrélation de Pearson ≥ 0.5). Les taxons surlignés sont non-indigènes. La contribution relative de ces espèces aux deux axes est présentée dans l'annexe 1.7.

Source de la variance	df	SS	F	P
Dates	1	49194	77.99	<0.001
Port	7	196000	109.75	<0.001
Date x Port	7	60868	34.08	<0.001
Résidus	305	88700		

Tableau 1.7. **Résultat de l'analyse testant l'effet de la date d'échantillonnage et des ports suivis sur l'abondance des différents taxons de faune sessile identifiés.** Les valeurs de degrés liberté (df), de la somme des carrés (SS), du pseudo F-ratio (F) et de la probabilité calculée par permutations (P) sont indiquées.

3.3. Comparaison des densités des populations de *Ciona intestinalis* et *Ciona robusta* entre ports et entre dates d'échantillonnage

Sur l'ensemble des deux périodes d'échantillonnage (i.e. mai et octobre 2014), *C. intestinalis* a été observée dans chacune des localités étudiées, excepté à l'Aber Wrac'h en mai 2014 où aucune des deux espèces de ciones n'était présente sous les pontons (Annexe 1.5). La distribution de *C. intestinalis* n'est pas vérifiée pour sa congénère non-indigène *C. robusta*, absente des ports de l'Aber Wrac'h et de Roscoff sur les deux périodes d'échantillonnage. La coexistence de *C. intestinalis* et *C. robusta* est cependant souvent la règle : elle a été observée au sein de 7 des 9 ports étudiés (Figure 1.17).

Il existe cependant des disparités entre les deux périodes : en mai 2014, la coexistence des deux espèces est observée dans 5 ports et, en octobre, elle est observée dans deux ports additionnels (Figure 1.17). Il existe par ailleurs, pour les deux espèces, d'importantes différences de densité entre périodes, avec une augmentation très marquée des densités en octobre par rapport à mai (Figure 1.17). Ces différences de densité entre sites et entre périodes d'échantillonnage sont significatives avec une interaction entre ces deux facteurs, et ceux pour les deux espèces analysées indépendamment (Tableau 1.8).

Enfin, il existe des différences très marquées entre les deux espèces. En mai 2014, la densité de *C. robusta*, (nombre d'individus par m²) varie en moyenne de 0.5 (± 2, écart type) au port du Château à 11.5 (± 23) au port de Perros Guirec tandis que la densité de *C. intestinalis* est beaucoup plus élevée et varie en moyenne de 29.5 (± 22) au Moulin Blanc à 305 (± 163) individus par m² au port de Trébeurden. Ces différences de densité se maintiennent en octobre 2014, avec des densités atteignant 568 individus par m² (± 435) au port de Perros Guirec pour *C. robusta*, et 1338 individus par m² (± 491) au port du Château pour *C. intestinalis*.

Tableau 1.8. **Résultats des analyses testant l'effet de la date d'échantillonnage et des ports suivis sur l'abondance des deux espèces : *C. robusta* et *C. intestinalis*.** Les valeurs de degrés liberté (df), de la somme des carrés (SS), de Pseudo F-ratio (F) et de la P-value calculée par permutations (P). Les résultats de comparaisons par paires sont présentés dans la Figure 1.17.

Source de la variance	df	<i>C. robusta</i>			<i>C. intestinalis</i>		
		SS	F	P	SS	F	P
Dates	1	132.4	398.3	<0.001	219.4	282.6	<0.001
Port	8	158.1	59.4	<0.001	279.0	44.9	<0.001
Date x Port	8	96.5	36.3	<0.001	80.5	13.0	<0.001
Résidus	343	113.4			264.8		

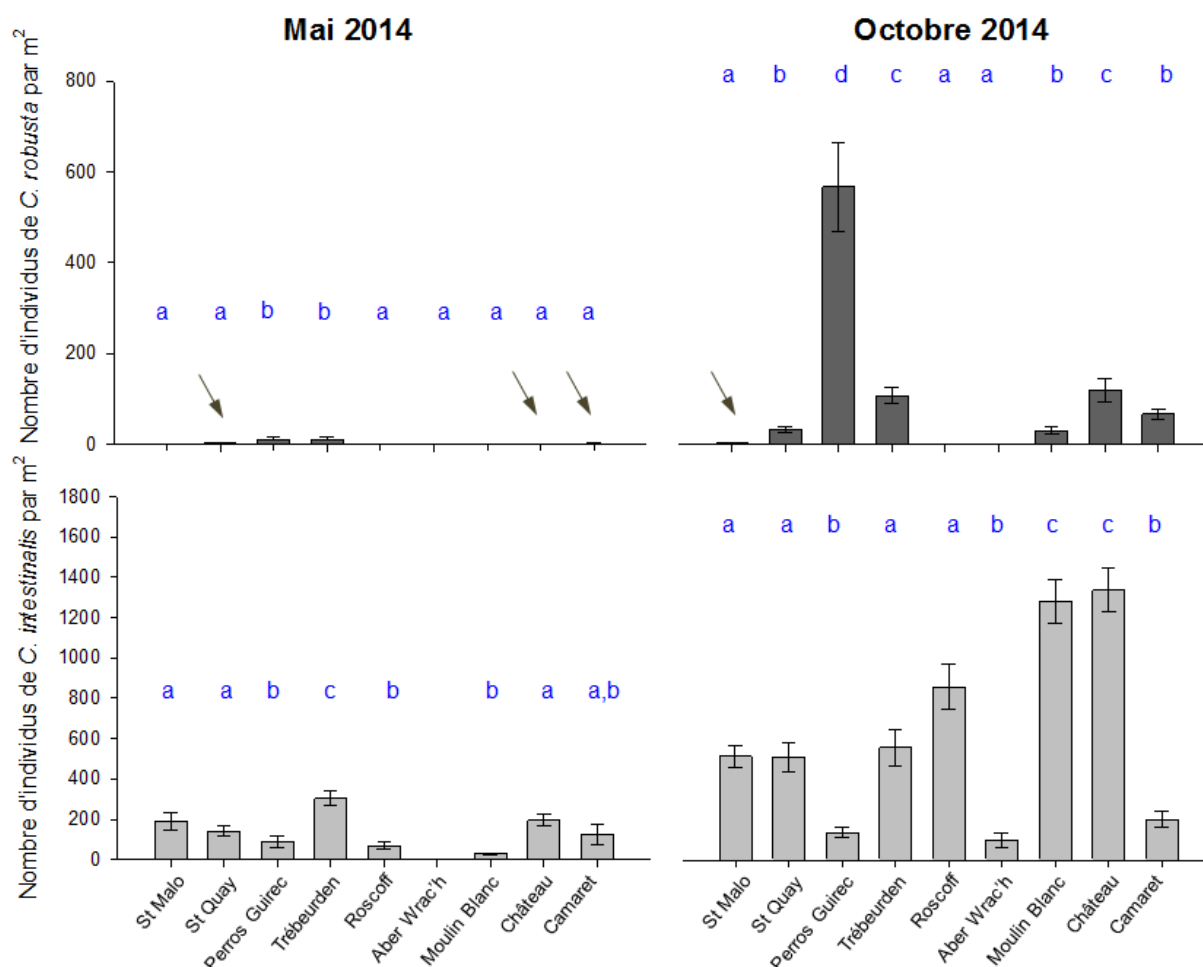


Figure 1.17. **Densité moyenne** (nombre d'individus par m² ± erreur standard) **des populations de *Ciona robusta* (barres noires, histogrammes du haut) et *C. intestinalis* (barres grises, histogrammes du bas)** par date et port. Les ports pointés d'une flèche dans les histogrammes du haut indique la présence de *C. robusta* non observable sur le graphique à cause de l'échelle de l'axe des ordonnées. Il faut d'ailleurs remarquer les différences d'échelles entre les graphiques réalisés pour *C. robusta* et *C. intestinalis*. Les résultats des tests de comparaison par paires entre sites (pour chaque date) sont indiqués au-dessus des barres d'histogramme : une même lettre indique qu'une absence de différence significative entre deux sites ($P > 0.05$).

Par ailleurs, dans tous les ports où les deux espèces coexistent, l'augmentation de la densité des individus par m² est plus importante pour *C. robusta* que pour *C. intestinalis*. Par exemple, à St Quay, la valeur moyenne de la densité des individus de *C. robusta* est 16 fois plus importante en octobre qu'au mois de mai 2014, et pour *C. intestinalis*, 4 fois plus importante. Il en est de même au port de Trébeurden où la valeur moyenne de la densité de *C. robusta* est 10 fois plus importante en octobre par rapport à *C. intestinalis* pour laquelle la valeur moyenne de densité augmente d'un facteur 2.

IV. Discussion

4.1. Synthèse des résultats obtenus

Les deux approches menées sur le terrain ont permis d'obtenir des données décrivant les communautés (faune sessile avec une étude additionnelle faisant un focus sur les ascidies uniquement) des habitats portuaires dans lesquelles sont installées *C. intestinalis* et *C. robusta*.

Le suivi spatial et temporel des **communautés de faune sessile** réalisé à l'aide de dispositifs de recrutement placé à 1.5 m sous la surface de l'eau a montré :

- 1) La dominance des taxons d'ascidies dans la majorité des habitats portuaires bretons.
- 2) Des variations de la composition des communautés majoritairement expliquées par des différences spatiales (entre ports), et surtout liées à l'effet du port de Perros Guirec; en revanche peu de variations ont été notées au cours du temps.
- 3) La présence d'individus de *C. intestinalis* en moyenne et forte abondance dans la majorité des ports suivis au contraire de *C. robusta* qui n'est présente que dans 3 ports et généralement en beaucoup plus faible abondance.

L'échantillonnage spatial et temporel des **peuplements d'ascidies** sous les pontons a confirmé ces résultats montrant notamment:

- 4) Des variations spatiales des peuplements d'ascidies, là encore majoritairement expliquées par un effet site

Ces convergences laissent à penser que l'utilisation de dispositifs expérimentaux de sédentarisation permet d'avoir une bonne représentation de la communauté en place, communautés qui semblent rapidement s'installer.

Néanmoins, le suivi plus spécifique du peuplement d'ascidie a permis de montrer également

- 5) des variations temporelles significatives entre mai (printemps) et octobre (automne) observées majoritairement dans les ports du Moulin Blanc et de l'Aber Wrac'h, qui s'ajoutent dans cette étude au port de Perros-Guirec dans la différenciation des peuplements entre sites.
- 6) la contribution importante de *C. intestinalis* et *C. robusta* dans la structure des peuplements d'ascidies.

Enfin, la dernière étude a permis de documenter précisément la présence et l'abondance des deux espèces de ciones dans ces habitats portuaires. Nous avons en particulier pu observer :

- 7) la présence d'individus des deux espèces dans la plupart des ports étudiés (i.e. 7 sur 9)
- 8) de fortes variations de densité entre les deux dates d'échantillonnage pour les deux espèces, mais avec une augmentation particulièrement importante de la densité des populations de *C. robusta* en octobre par rapport à mai 2014.

4.2. Les ascidies : une classe dominante de la faune sessile des habitats portuaires qui témoigne de l'importance des processus d'homogénéisation biotique

Comme mis en évidence dans de précédentes études réalisées sur les communautés d'espèces indigènes et non-indigènes dans les habitats portuaires (e.g. Arenas *et al.* 2006; Nydam & Stachowicz 2007; Lambert & Lambert 2008; Lindeyer & Gittenberger 2011), la classe des ascidies est en diversité et en abondance un taxon majeur, voire dominant des communautés de faune sessile étudiées (à l'exception de Perros Guirec dominé par des bryozoaires).

Les ascidies dominantes dans la majorité des ports étudiés sont des espèces indigènes, telles qu'*Ascidella aspersa*, *Phallusia mammillata* et *C. intestinalis* mais également des espèces

introduites, telles que *Corella eumyota* et *Styela clava*. Ces ascidies présentent une grande diversité de leurs traits d'histoire de vie (Tableau 1.9) notamment quant à leurs modalités de reproduction. Certaines sont autogames comme par exemple *Corella eumyota* et d'autres peuvent se reproduire de façon clonale (ou bourgeonnement), par exemple les espèces non-indigènes *Didemnum vexillum* et *Perophora japonica*. Ces traits d'histoire de vie ont pu favoriser leur établissement dans les régions où elles ont été introduites : la capacité de se reproduire par autofécondation ou par clonalité permet à un individu unique de se propager rapidement, y compris pour coloniser de nouveaux habitats à une échelle régionale. De même la grégarité est un trait d'histoire de vie facilitant la rencontre et la reproduction entre les individus d'espèces benthiques sessiles. L'association de la capacité à se reproduire par autofécondation et d'un comportement grégaire a par exemple été proposée pour expliquer le succès d'introduction de *C. eumyota* en Bretagne (Dupont *et al.* 2007).

Tableau 1.9. **Caractéristiques biologiques des différentes espèces d'ascidies** présentes dans les habitats portuaires bretons. Le statut (*i.e.* I : Indigène, NI : Non-Indigène, C : Cryptogénique) de ces espèces en Manche est indiqué.

Espèces/Taxons	Statut	Fécondation	Système de reproduction	Association
<i>Ascidia mentula</i>	I	Externe	Allogame	Solitaire
<i>Asciella aspersa</i>	I	Externe	Allogame	Solitaire
<i>Asciella scabra</i>	I	Externe	Allogame	Solitaire/Grégaire
<i>Asterocarpa humilis</i>	NI	Interne	Allo- et autogame	Solitaire
<i>Botryllus schlosseri</i>	C	Interne	Allogame et clonal	Coloniale
<i>Ciona robusta</i>	NI	Externe	Allogame	Solitaire
<i>Ciona intestinalis</i>	I	Externe	Allogame	Solitaire
<i>Clavelina lepadiformis</i>	I	Interne	Allogame et clonal	Coloniale
<i>Corella eumyota</i>	NI	Externe	Allo- et autogame	Grégaire
<i>Didemnum vexillum</i>	NI	Interne	Allogame et clonal	Coloniale
<i>Diplosoma listerianum</i>	C	Interne	Allogame et clonal	Coloniale
<i>Perophora japonica</i>	NI	Interne	Allogame et clonal	Coloniale
<i>Phallusia mammillata</i>	I	Externe	Allogame	Solitaire
<i>Styela clava</i>	NI	Interne	Allogame	Solitaire

Dans nos études, que ce soit par des méthodes utilisant des dispositifs expérimentaux pour étudier les communautés colonisant des substrats vierges ou des cadrats pour étudier les peuplements établis, les valeurs de diversité β (qui mesure la différence entre sites des espèces identifiées) sont proches de la valeur seuil de 1, et ce sur l'ensemble des dates d'échantillonnages ou périodes étudiées. Ce résultat traduit une homogénéité en termes d'espèces présentes dans ces habitats portuaires dans notre zone d'étude. Or il faut rappeler que les ascidies font partie des espèces d'invertébrés marins à cycle benthopélagique qui possèdent de très courtes durées de vie pélagiques, avec des distances de dispersion souvent inférieures à une dizaine ou une centaine de mètres (Lambert 2005; Tableau 1.10). Ces distances de dispersion sont d'un à trois ordres de magnitudes inférieures à celles caractérisant les mollusques dans leur grande majorité. Du fait de cette courte durée de vie pélagique, la dispersion naturelle seule ne semble pas pouvoir expliquer une homogénéisation biotique à une échelle régionale sur des échelles de temps courtes. Par exemple, pour l'ascidie *Asterocarpa humilis* (trouvée dans tous les ports bretons étudiés et probablement arrivée au début des années 2000), Bishop *et al.* (2015) ont montré sa propagation en 3 ans sur plusieurs centaines de kilomètres le long des côtes sud de l'Angleterre.

Si la dispersion naturelle joue un rôle, il devrait donc être mineur sur des échelles de temps courtes et à une échelle régionale. La propagation de ces espèces d'ascidies, et l'homogénéisation biotique qui peut en résulter, est probablement le fait d'un effet important des transports maritimes locaux et régionaux (bateaux de plaisances, ferry, ou navires commerciaux), que ce soit par le biais du fouling ou des ballasts. Ces effets d'homogénéisation biotique par le biais des transports intra régionaux ont déjà été mis en évidence par le suivi d'eaux de ballast le long des côtes Nord-Américaines (*i.e.* en Californie (Wasson *et al.* 2001) et NE du Canada (Briski *et*

al. 2012)). Ces vecteurs ont été proposés pour expliquer l'expansion rapide des ascidies non-indigènes *Perophora japonica* et *Asterocarpa humilis* en Manche Occidentale (Perez-Portela *et al.* 2012; Bishop *et al.* 2015). Remarquons que le rôle de ce type de modalités de la dispersion par les activités humaines est le plus souvent mise en évidence par l'étude d'espèces non-indigènes mais qu'il est susceptible d'agir avec autant d'efficacité sur les espèces indigènes occupant des habitats artificiels où se concentrent des activités de transports maritimes.

Tableau 1.10. **Durée de vie larvaire et distance de dispersion estimée chez des invertébrés marins à cycle bento-pélagique.** Source : Tableau 1 de l'article Shanks (2009). La lettre entre parenthèse après le nom d'espèce indique la méthode utilisée pour estimer la distance de dispersion : des approches expérimentales (E), des données d'observation de la propagation d'espèces introduites (I), des observations *in situ* de larves dispersantes (O), du marquage expérimental de larves (T).

Organism (data source)	Dispersing stage	Propagule duration	Dispersal distance	References
Cnidaria				
<i>Allopora californica</i> (E)	demersal planulae	minutes	0.5 m	Fritchman (1974); Ostarello (1976)
<i>Athenaria actinia</i> (O)	egg	minutes	1 m	Nyholm (1940)
<i>Alcyonium siderium</i> (E)	demersal planulae	4.5 days	3 m	Sebens (1983)
<i>Favia fragum</i> (E)	planulae	4 min	3 m	Carlson and Olson (1993)
<i>Heliopora coerulea</i> (E)	planulae	6 h	350 m	Harii <i>et al.</i> (2002); Harii and Kayanne (2003)
<i>Tubularia larynx</i> (O)	actinula	<5 min pelagic, crawling 1 day	centimeters to meters	Pyefinch and Downing (1949)
Sponges				
<i>Scopalina lophyropoda</i> (E)	larvae	5–10 min	0.5–2 m	Uriz <i>et al.</i> (1998)
<i>Halichondria moorei</i> (O)	larvae	60 h	2 m	Bergquist and Sinclair (1968)
<i>Stylopsus</i> spp. (O)	crawling larvae	1–4 days	meters	Ayling (1980)
<i>Chondropsis</i> spp. (O)	crawling larvae	1–4 days	meters	Ayling (1980)
Tunicates				
<i>Molgula pacifica</i> (O)	adhesive benthic egg	36 h	<1 m	Young <i>et al.</i> (1988)
<i>Trididemnum solidum</i> (O)	tadpole larvae	15 min	<200 m ¹	van Duyl <i>et al.</i> (1981)
<i>Ecteinascidia turbinate</i> (O)	tadpole larvae	81.5 s	6.87 m	Bingham and Young (1991)
Bryozoans				
<i>Crisia denticulate</i> (T)	larvae	<2 h ²	10–20 m	Pemberton <i>et al.</i> (2007)
<i>Tubulipora tuba</i> (E)	larvae	<2 h ²	1 m	Knowlton and Jackson (1993)
Molluscs				
<i>Crepidula fornicata</i> (I)	larvae	2–3 weeks	28.5 km	Coe (1949); Dommasnes and Scham (1973)
<i>Rapana venos</i> (I)	larvae	14–17 days	100 km	Zolotarev (1996); Harding and Roger (1999)
<i>Philine</i> spp. (I)	larvae	30–40 days	260 km	Hansen and Ockelmann (1991); Cadien and Ranasinghe (2003)
<i>Dendropoma corallinaceum</i> (O)	crawling larvae	1–5 days	<1 m	Hughes (1978)
<i>Venerupis philippinarum</i> (I)	larvae	3–4 weeks	20 km	Bourne (1982); Quayle (1964); Strathmann (1987)
<i>Musculista senhousia</i> (I)	larvae	16 days	116 km	Willan (1987); Semenikhina <i>et al.</i> (2008)
<i>Perna viridis</i> (I)	larvae	2–3 weeks	33 km	Benson <i>et al.</i> (2001); Fajans and Baker (2005)
<i>Mya arenaria</i> (I)	larvae	10–35 days	35 km	Strathmann (1987); Zolotarev (1996)
<i>Drupella cornus</i> (T)	larvae	3 weeks	<100 m	Johnson <i>et al.</i> (1993)
<i>Adalaria proxima</i> (E)	larvae	1–3 days	100 m	Lambert <i>et al.</i> (2003)
Polychaetes				
<i>Spirorbis spirillum</i> (E)	larvae	15 min	<500 m	Dirnberger (1993)
<i>Terebrasabella heterouncinata</i> (I)	crawling larvae	12 h	15 m	Kuris and Culver (1999); Culver and Kuris (2000)
<i>Marenzelleria viridis</i> (I)	larvae	8 weeks	55–64 km	Boudouresque (1994); Boichert (1997)
Crustaceans				
<i>Paralithodes camtschaticus</i> (I)	larvae	90 days	32 km	Kuzmin <i>et al.</i> (1996); Epelbaum <i>et al.</i> (2006)
<i>Balanus glandula</i> (I)	larvae	2–4 weeks	85 km	Schwindt (2007)
<i>Cancer magister</i> (T)	larvae	3–4 months	500 km	Shanks (unpubl. data)
Echinoderms				
<i>Asterias amurensis</i> (I)	larvae	40–50 days	22.5 km	Buttermore <i>et al.</i> (1994); Nozais <i>et al.</i> (1997)
<i>Acanthaster planci</i> (I)	larvae	14 days	49–81 km	Moran <i>et al.</i> (1992)

Outre l'observation de terrain et les analyses des communautés, la génétique des populations est une autre approche qui peut permettre de tester le rôle des transports maritimes sur la connectivité des populations d'espèces établies dans les milieux portuaires. Compte-tenu des capacités naturelles de dispersion très faibles chez les ascidies, et si ces dernières sont essentiellement transportées par des navires ou autres substrats artificiels (e.g. bouées, plateformes qui sont régulièrement déplacées), nous ne devrions pas observer de schémas de structure génétique conformes à ceux attendus sous l'hypothèse de dispersion naturelle, par exemple des modèles d'isolement génétique par la distance géographique, ou encore de groupes génétiques différenciés dans des zones isolées par des structures hydro-dynamiques particulières telles que des gyres. Plus généralement, nous devrions observer une faible voire une absence de structure

génétique entre les populations, comme mis en évidence chez l'ascidie non-indigène *Styela clava* par Dupont et collaborateurs (Dupont *et al.* 2009). Ces attendus sont cependant à moduler en fonction de l'histoire de l'introduction dans le cas des espèces non-indigènes. Il serait intéressant dans ce contexte de réaliser une étude pluri-spécifique: en intégrant des espèces indigènes et non-indigènes, présentant des traits d'histoire de vie variables notamment quant à leur capacité de dispersion naturelle. Ce type de donnée pourrait nous permettre de tester des modèles de dispersion via les activités humaines, qui devraient globalement se traduire par des proximités génétiques indépendantes de la distance entre les sites mais dépendantes des voies maritimes les plus fréquentes et de la durée de vie larvaire.

Cette homogénéité des communautés d'espèces, en particulier concernant les ascides, se retrouve également à l'échelle mondiale. Les espèces d'ascidies que nous avons dénombrées dans nos études ne sont en effet pas uniques à notre région d'étude, y compris indigènes. Par exemple, l'ascidie solitaire *A. aspersa*, dominante dans son aire de distribution naturelle en Europe l'est également en Atlantique Nord-Ouest où elle est introduite (Stachowicz *et al.* 2002; Mackenzie 2011). De même, l'ascidie solitaire *Styela clava*, originaire du Pacifique Nord-Est a été introduite dans de nombreuses régions telles que le Pacifique Sud-Est et les côtes Est et Ouest Nord-américaine. En Atlantique Nord-Ouest, cette espèce est d'ailleurs considérée comme une nuisance majeure des cultures conchylicoles (Clarke & Therriault 2007). Une étude de phylogéographie, utilisant le marqueur mitochondrial COI, a montré chez cette espèce une distribution partagée de la diversité génétique à l'échelle mondiale, et notamment entre les côtes de l'Atlantique Nord-Est et Nord-Ouest (Figure 1.18; Goldstien *et al.* 2011). Ce résultat suggère une forte connectivité d'origine humaine entre les différentes régions océaniques. Cette étude, comme de nombreuses autres de génétique des populations portant sur les espèces non-indigènes, souligne l'existence d'une homogénéisation génétique à grande échelle. Comme souligné par Olden *et al.* (2004) et Dar & Reshi (2014), il existe de nombreuses facettes à ce processus appelé « homogénéisation biotique » qui ont différentes conséquences écologiques et évolutives. Le fait est bien décrit mais ces conséquences génétiques, taxonomiques et fonctionnelles restent encore à explorer.

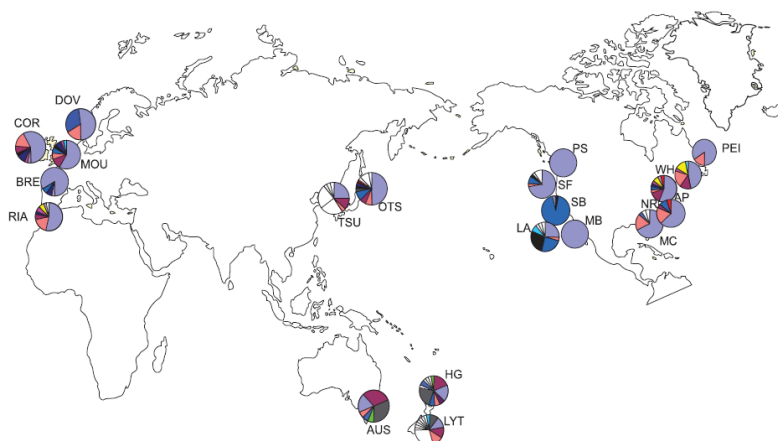


Figure 1.18. Distribution mondiale de la diversité haplotypique (marqueur mtCOI) des populations de l'ascidie japonaise *Styela clava*. Figure issue de Goldstien *et al.* (2011).

4.3. Des communautés globalement homogènes mais avec des variations locales: un effet des conditions environnementales ?

Dans les différentes études menées, nous avons observé des variations significatives entre localités, et particulièrement d'une localité, le port de Perros-Guirec. Que ce soit à l'aide du suivi des communautés de faune sessile ou du peuplement d'ascidies, les analyses de richesse spécifique et d'abondance d'espèces ont révélé une composition atypique des communautés

d'espèces au port de Perros Guirec. Dans l'analyse des communautés de faune sessile, ce port est caractérisé par une majorité d'espèces encroûtantes, représentées par exemple par les bryozoaires *Watersipora subatra* et *Cryptosula pallasiana* (Figure 1.13), ainsi que par une plus grande proportion d'espèces non-indigènes (Figure 1.11). L'analyse des peuplements d'ascidies a montré quant à elle, une forte abondance de l'espèce non-indigène *C. robusta* dans ce port.

Cette composition atypique pourrait être partiellement expliquée par les caractéristiques de ce port. En effet, il s'agit d'un port à seuil et écluse, qui est totalement isolé du milieu naturel environnant lors des marées basses voire pendant plusieurs jours lors des marées de mortes eaux. De par son isolement, la masse d'eau du port de Perros-Guirec peut subir des variations importantes des paramètres physico-chimiques. C'est par exemple le cas de la température où de plus fortes variations des valeurs moyennes y ont été observées en comparaison des autres ports lors du suivi des communautés de faune sessile (Figure 1.19).

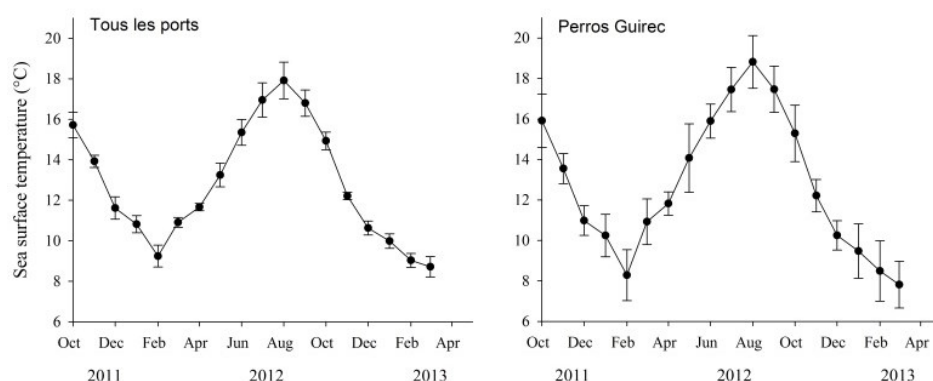


Figure 1.19. **Moyenne mensuelle (± écart-type) de la température** enregistrée dans tous les ports suivis, où ont été caractérisées les communautés de faune sessile et au port de Perros Guirec uniquement. Les données de température ont été obtenues à l'aide d'enregistreurs automatiques (Tidbit®v2) placés sur les dispositifs entre 2011 et 2013.

Différentes études récentes ont mis en évidence de plus fortes capacités physiologiques des espèces marines non-indigènes (par rapport aux espèces indigènes) à résister aux variations des facteurs abiotiques tels que la température (Stachowicz *et al.* 2002; Zerebecki & Sorte 2011; Lejeune *et al.* 2014; et pour une revue chez les invertébrés marins non-indigènes, Lenz *et al.* (2011)). Par exemple, l'étude expérimentale de thermotolérance réalisée par Zerebecki & Sorte (2011) sur des espèces d'ascidies et de bryozoaires indigènes et non-indigènes des habitats portuaires de Californie, met en évidence une plus forte résistance des espèces non-indigènes aux variations de température par rapport aux espèces indigènes (Tableau 1.11). C'est notamment le cas pour le bryzoaire encroûtant *Watersipora subatra* (décrit alors comme *W. subtorquata* mais une révision du genre a été réalisée depuis (Vieira *et al.* 2014)) qui tolère des variations de température allant de 6 à 30°C (Tableau 1.11). On notera que cette espèce est l'une des espèces qui contribuent le plus à la différenciation du port de Perros Guirec par rapport aux autres ports dans la PCoA présentée en Figure 1.13.

Species	Origin	Taxon	Temp. Limits (°C)		
			Min.	Max.	LT ₅₀
<i>Distaplia occidentalis</i>	Native	Tunicate	-0.6	20.0	21.9
<i>Ascidia ceratodes</i>	Native	Tunicate	6.3	28.6	24.3
<i>Bugula neritina</i>	Invasive	Bryozoan	2.2	30.6	24.4
<i>Bugula californica</i>	Native	Bryozoan	7.2	29.4	24.5
<i>Watersipora subtorquata</i>	Invasive	Bryozoan	6.7	30.6	24.7
<i>Botrylloides violaceus</i>	Invasive	Tunicate	-0.6	29.3	25.3
<i>Didemnum vexillum</i>	Invasive	Tunicate	2.2	30.6	26.1
<i>Diplosoma listerianum</i>	Invasive	Tunicate	-0.6	30.0	27.9
<i>Botryllus schlosseri</i>	Invasive	Tunicate	2.8	30.6	28.3

Tableau 1.11. **Limite inférieure et supérieure de tolérance aux variations de températures d'espèces indigènes et non-indigènes** prélevées dans le port de Bodega Bay en Californie. Tableau tiré de Zerebecki et Sorte (2011). On note que l'espèce citée *Watersipora subtorquata* est en réalité l'espèce *W. subatra*.

L'ajustement aux conditions thermiques du cycle de vie de l'ascidie *Didemnum vexillum* est également un mécanisme qui pourrait expliquer l'établissement de cette ascidie non-indigène dans les eaux chaudes de la Mer Méditerranée (Ordóñez *et al.* 2015). Plus généralement, l'acclimatation par plasticité phénotypique est considérée comme un processus majeur pour expliquer la « réussite » des espèces non-indigènes aux nouveaux environnements dans lesquelles elles sont introduites, comme cela l'a été bien montré lors de méta-analyses conduites chez les plantes (Richards *et al.* 2006; Davidson *et al.* 2011). Il n'existe pas à ma connaissance de méta-analyses similaires chez les espèces marines, mais les quelques exemples cités ci-dessus laissent à penser que ce mécanisme joue également un rôle majeur lors des processus d'introduction d'espèces marines.

Une autre source de variation importante dans nos études, en particulier des peuplements d'ascidies, est la période d'étude : par exemple, des variations significatives du peuplement d'ascidies ont été observées entre les échantillonnages réalisés en mai 2014 et octobre 2014 dans les ports du Moulin Blanc et de l'Aber Wrac'h. Ces deux ports, situés à l'embouchure de rivières (Figure 1.20), sont probablement fortement influencés par des arrivées d'eaux douces.



Figure 1.20. **Position des ports étudiés par rapport à l'embouchure des rivières** (1 : St Malo, 2 : Saint Quay, 3 : Perros Guirec, 4 : Trébeurden, 5 : Roscoff, 6 : Aber Wrac'h, 7 : Moulin Blanc, 8 : Château et 9 : Camaret).

Plusieurs études ont montré que les variations de salinité jouaient un rôle fondamental sur la distribution spatiale et temporelle des ascidies indigènes comme non-indigènes ainsi que sur leur abondance locale (Lambert 2005; Tracy & Reyns 2014). Des mortalités massives d'espèces d'ascidies ont par exemple été signalées à la suite d'apports massifs en eau douce dans les ports du sud de la Californie (Lambert & Lambert 1998, 2003; Tracy & Reyns 2014). C'est également une des explications données aux résultats préliminaires obtenus dans l'étude des communautés de faune sessile à l'échelle de la Manche (Encadré 5) : dans cette étude, trois ports localisés à Plymouth ont montré des patrons de diversité des communautés très différents des autres entre les dates de récupération des plaques de mars 2011 et mars 2013 et celles de mars 2012. Des événements de dessalures des eaux de surface du port, du fait des arrivées d'eau douce du fleuve situé à proximité de ces ports avaient été notés dans ces ports. Suite à ces événements, d'importantes mortalités de la faune sessile installées sur les pontons, incluant des ascidies, ont été observées. Il en était de même sur les panels expérimentaux sur lesquels très peu d'espèces et d'individus avaient été dénombrés (J.D.D. Bishop et S. Bouchemousse, données non publiées). Cependant, il est difficile d'établir si le patron de variations du peuplement d'ascidies observé en Bretagne est bien une conséquence des influences des arrivées d'eau douce ou la résultante d'événements stochastiques non-étudiés et non observables (e.g. pollution).

En regard de ces effets supposés des variations de température et de salinité, des approches expérimentales testant spécifiquement les effets des variations de paramètres abiotiques sur les communautés d'espèces des habitats portuaires que nous avons étudiées seraient à réaliser ainsi qu'un suivi *in situ* des paramètres environnementaux, pour mieux comprendre les patrons de distribution et d'abondance des communautés de faune sessile établies dans les habitats portuaires bretons.

4.4. Quelles méthodes utiliser pour répertorier les espèces d'ascidies non-indigènes ? Enjeux et limites

Au travers des deux études présentées dans ce chapitre, les mêmes ascidies non-indigènes ont été identifiées (Annexe 1.4 et 2.5). Ces espèces sont également les mêmes que celles identifiées par Bishop et collaborateurs (2015) lors des derniers inventaires réalisés en 2010 et 2013 par une approche de type « RAS » en Bretagne. La similitude des résultats obtenus entre l'approche « plaques expérimentales » et « cadrat » semble indiquer que 1) la vitesse d'établissement des peuplements d'ascidies est très rapide (beaucoup d'espèces répertoriées ont en effet des cycles de vie et des temps de génération courts) et/ou 2) que les pontons colonisés dans les milieux portuaires sont très dynamiques et perturbés (comme en témoigne les effets de « dessalure » discutés dans le paragraphe précédent).

Les résultats obtenus suggèrent donc que les méthodes d'observation ont peu d'influence sur les résultats obtenus en termes de présence/absence de taxons puisque des listes relativement identiques ont été obtenues avec des dispositifs de recrutement, des échantillonnages utilisant des cadrats en plongée sous les pontons ou des RAS en surface. Il en est de même avec l'emploi d'observations *in situ* en plongée qui est une méthode classique pour inventorier les espèces des milieux portuaires, en utilisant des protocoles similaires à ceux employés en surface tels que des RAS (Annexe 1.8). L'utilisation de la plongée pour réaliser des RAS présente de nombreuses contraintes (temps limité, niveau d'expertise des plongeurs) mais a l'avantage de permettre l'accès à une plus grande diversité de micro-habitats (Annexe 1.8). Les ports sont en effet des « habitats » très hétérogènes. Les résultats peuvent alors différer quand il s'agit de données d'abondance. Par exemple, des RAS de 30 minutes réalisés en plongée en 2013 au port de Roscoff ont mis en évidence une importante variation de l'abondance de l'ascidie coloniale non-indigène *Didemnum vexillum* en fonction des micro-habitats du port (Figure 1.21) : l'espèce est observée en faible abondance sous les pontons, un résultat comparable à ceux issus des échantillonnages réalisés avec les cadrats dans ce chapitre, mais elle est très abondante dans les structures rocheuses de la digue interne ainsi que sur des structures immergées constamment telles que le quai du môle Ferry ou les piliers (Figure 1.21).

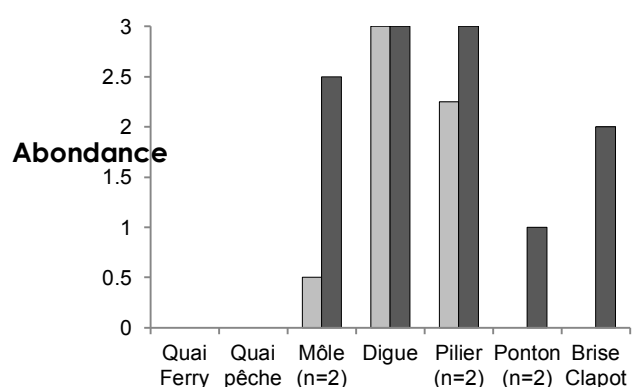


Figure 1.21. **Abondance de l'espèce non-indigène *Didemnum vexillum* dans différents micro-habitats du port de Roscoff au printemps 2013 (barres d'histogramme en gris clair) et en automne 2013 (gris foncé).** L'abondance est évaluée à partir d'une échelle semi-quantitative allant de 0 à 3, dans un délai de 30 minutes d'observation en plongée.

Cet effet « micro-habitat » traduit les fortes variations existant dans ce type d'habitat par exemple en termes d'exposition à la lumière ou de courant. La prise en compte de cette hétérogénéité locale est d'ailleurs soulignée dans les protocoles de référence développés originellement en Australie (Hewitt & Martin 2001) pour le suivi des espèces non-indigènes dans les habitats portuaires.

Les différentes méthodes employées ont cependant une même limite, qui est celle de l'identification taxonomique. Cette limite est vraie pour de nombreux groupes taxonomiques mais nous l'illustrerons ici chez les ascidies. Dans plusieurs cas, nous avons fait le choix de ne pas réaliser une identification taxonomique au niveau spécifique. C'est un problème rencontré au laboratoire

lors d'études globales (à l'échelle des communautés) mais surtout lors des inventaires menés sur le terrain, en surface et en plongée, en particulier lorsqu'il s'agit de RAS. Ainsi, dans les deux études présentées dans ce chapitre, seules les espèces nominales *Didemnum vexillum* et *Diplosoma listerianum* ont pu être systématiquement identifiées jusqu'à l'espèce au sein de la famille des Didemnidae. Les autres espèces de cette famille (dont *Didemnum coriaceum*, *Diplosoma spongiformis*, *Lissoclinum perforatum*), présentes dans plusieurs des localités étudiées, n'ont pas été identifiées sur le terrain car nous n'étions pas assurés de les identifier correctement. Par ailleurs, l'identification morphologique seule est souvent limitante, voire impossible quand il s'agit d'identifier des espèces cryptiques pouvant regrouper des espèces indigènes ou non-indigènes (comme c'était le cas encore récemment pour *C. intestinalis* et *C. robusta*).

Un cas illustrant ces difficultés et limites est celui des ascidies coloniales du genre *Botrylloides*. En Manche Occidentale, ce genre présente deux espèces non-indigènes appelées *B. diegensis* et *B. violaceus* (Bishop *et al.* 2015), toutes deux invasives à l'échelle mondiale, et une espèce cryptogénique (décrite en Europe et probablement native de cette région) appelée *B. leachi*. Ces trois taxons sont en principe, distinguables par un certain nombre de traits morphologiques mais nous avons choisi de ne pas les distinguer, à l'instar du choix fait par Bishop *et al.* (2015) dans leur RAS. Deux sources possibles de confusions taxonomiques ont en effet été mises en évidence au sein de ce genre en Manche Occidentale. Premièrement, les critères morphologiques simples utilisables sur le terrain par des « non-experts » ne sont pas applicables systématiquement. Un des critères les plus simples de reconnaissance de *B. diegensis* est un contraste de couleur très net entre les zoïdes (jaune vif) et le tissu interstitiel (marron foncé). Or, un grand nombre de morphes intermédiaires entre *B. diegensis* et *B. violaceus* ont été révélés (Figure 1.22) et des analyses moléculaires ont montrées que certaines colonies sans contraste de couleur (comme *B. violaceus*) étaient en fait des colonies de *B. diegensis* (Roby & Viard, données non publiées). Deuxièmement, ces mêmes études moléculaires ont mis en évidence un nouveau clade en Angleterre qui pourrait être une nouvelle espèce (cryptique), morphologiquement similaire à *B. violaceus* mais divergent par environ 10% avec le marqueur COI (et également distinguées par le marqueur nucléaire 18S). La distribution de ce clade est encore inconnue. Ces résultats ont été obtenus sur des échantillons prélevés au cours de différentes expériences et suivis en Bretagne et Angleterre. Bock *et al.* (2011) avaient déjà mis en évidence un clade divergent (différent de celui identifié en Manche) dans les populations de *B. violaceus* introduites en Amérique du Nord.

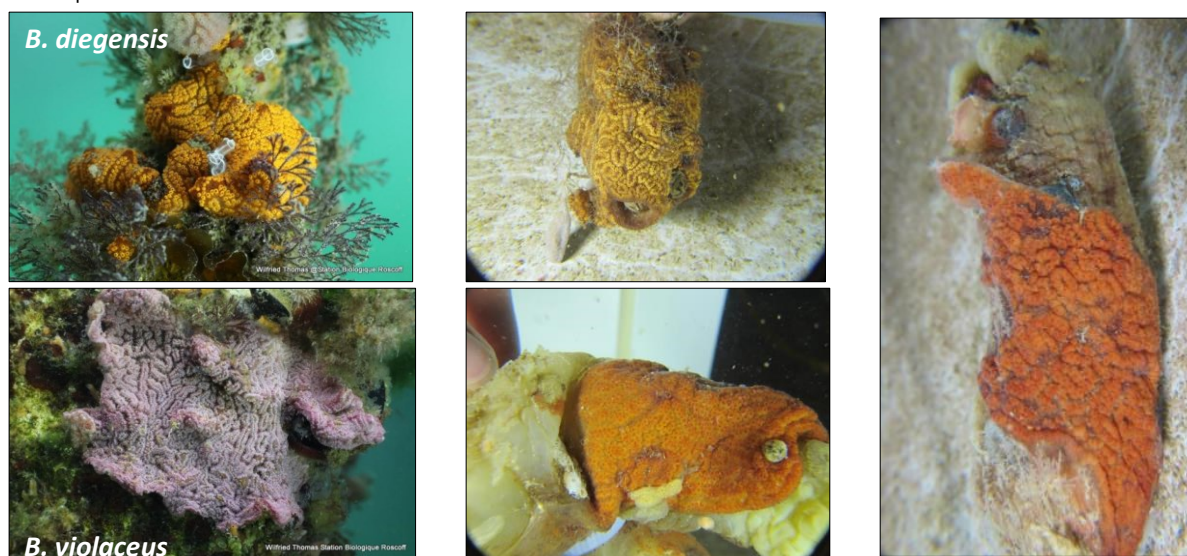


Figure 1.22. **Présentation des espèces *B. diegensis* et *B. violaceus*** (© Wilfried Thomas, Station Biologique de Roscoff) et de différents morphes intermédiaires non-identifiables morphologiquement.

Compte tenu à la fois des complexités de l'identification morphologiques et de l'existence possible de plusieurs espèces cryptiques, ces taxons ont été regroupés, dans les différentes études

menées, au sein du genre *Botrylloides*. La découverte de nouvelles espèces cryptiques, grâce aux outils moléculaires utilisés dans des études de phylogéographie et phylogénie, est de plus en plus fréquente dans des groupes taxonomiques complexes tels que les ascidies. Mise à part les ascidies, d'autres genres ou espèces nominales ont récemment été pointés comme problématique, tels que *Botryllus schlosseri* (Bock *et al.* 2012) et *Diplosoma listerianum* (Perez-Portela *et al.* 2013). Le cas des espèces du genre *Botrylloides* illustre un problème récurrent dans des groupes taxonomiques complexes pour lesquels il existe malheureusement de moins en moins d'experts en taxonomie.

Une alternative partielle à l'identification sur critères morphologiques est de recourir à l'emploi de barcoding moléculaire*, quand des barcodes* existent. Dans le cas des espèces non indigènes, une identification correcte et exhaustive des espèces nominales permet :

- 1) de valider des identifications faites rapidement sur le terrain et confirmer la présence de taxons encore inconnus dans les listes d'espèces non-indigènes d'une région donnée. C'est notamment ce qui a été réalisé pour *Asterocarpa humilis* en Manche (Bishop *et al.* 2013),
- 2) de participer à des détections précoces quand ces techniques sont employées sur des stades jeunes, tels que des larves, par exemple en analysant des eaux de ballast,
- 3) d'obtenir des listes de taxons identifiés au niveau spécifique et donc des inventaires d'espèces plus robustes et précis,
- 4) de prendre en compte dans les inventaires les espèces cryptiques ou pseudo-cryptiques.

L'extension des méthodes de barcoding moléculaire à l'échelle de la communauté entière est une autre perspective mises en avant récemment (Comtet *et al.* 2015; Cristescu 2014). Les techniques de metabarcodes emploient du séquençage haut-débit de fragment d'ADN court provenant d'un échantillonnage environnemental (e.g. sol, sédiment, eau de mer, etc.). Elles pourraient donc se révéler particulièrement intéressantes pour accéder à la diversité globale d'un peuplement d'espèces comme les ascidies voire de la communauté dans son ensemble (Darling & Blum 2007; Darling & Mahon 2011; Cristescu 2014). Cette méthode pourrait également permettre de détecter des espèces non-indigènes dans les premières étapes de l'introduction (quand les espèces non indigènes sont encore rares) et ainsi de prendre des mesures de confinement voire d'éradication efficaces avant sa phase d'expansion (Darling & Blum (2007) et Comtet *et al.* (2015) pour revues). Une telle approche serait par exemple intéressante pour mener un travail ciblé sur l'espèce de bryzoaire encroûtant *Schizoporella japonica*. Cette espèce a été observée dans le sud de l'Angleterre lors des derniers RAS réalisés par Bishop *et al.* (2015) mais elle est encore absente le long des côtes bretonnes. Sachant que les espèces présentes sur l'une de ces deux côtes de la Manche sont généralement observées sur la côté opposée après un temps de latence (Bishop *et al.* 2015), l'utilisation de metabarcodes sur des échantillons environnementaux pourrait permettre de la détecter avant son installation.

Il reste cependant encore de nombreux verrous à lever pour utiliser en routine ces méthodes de barcoding et metabarcoding moléculaires. Par exemple, concernant les méthodes de barcoding, il faut souligner que très peu d'espèces non-indigènes ont des barcodes référencés dans les banques de référence telles que BOLD (base de données moléculaire associée au Barcoding of Life Programme) (Comtet *et al.*, 2015). Chez les ascidies, quel que soit leur statut, une extraction des données de référence disponibles dans BOLD (réalisée début septembre 2015) montre que des séquences de référence ne sont disponibles que pour 6.7% des 2874 espèces acceptées (données WORMS) dans la classe des Ascidiacea. Il existe donc un énorme travail à réaliser pour alimenter ces banques, ce qui implique un important travail de recherche et de développement en amont, notamment dans le domaine de la taxonomie intégrative. Concernant le metabarcoding, la même limite existe avec en plus des limites concernant les techniques d'échantillonnages (afin d'extraire des ADN représentatifs de la communauté en

place) et le développement/choix de marqueurs pertinents permettant de discriminer les individus jusqu'à l'espèce sur une large gamme taxonomique (Cristescu 2014; Comtet *et al.* 2015).

4.5. *Ciona intestinalis* et *C. robusta* : deux espèces présentes et abondantes le long des côtes bretonnes

Au cours des études présentées dans ce chapitre, l'espèce non-indigène *C. robusta* a été trouvée dans 7 des 9 ports étudiés. Elle n'est absente que dans les ports de l'Aber Wrac'h et de Roscoff. Son absence à l'Aber Wrac'h a été constatée constamment quelque soit les études, les dates et le type d'observations réalisés par le laboratoire d'accueil depuis 2010. Il semble donc que l'espèce n'y ait jamais été introduite ou ne s'y soit jamais installée. Au port de Roscoff, d'autres données obtenues au cours de ma thèse mais non présentée dans ce manuscrit (notamment une étude de type RAS en plongée, voir l'annexe 1.8 avec quelques-uns des résultats obtenus synthétisés pour un chapitre de livre à paraître sur la plongée scientifique) permettent de dire que *C. robusta* a été introduite à Roscoff dès l'ouverture du port, suite à sa construction en 2010-2011. *C. robusta* y a été observée en faible abondance en 2011 et 2012 mais a ensuite disparue complètement aussi bien des pontons que des autres structures du port (*i.e.* piliers, digue, brise-clapot, etc.). Cette absence a été encore confirmée en juin 2015 (F. Viard, observation personnelle). Il semble donc qu'il existe des conditions locales d'origine biotique ou abiotique, non favorables à son maintien.

Une des hypothèses expliquant la disparition de *C. robusta* aurait pu être un processus d'exclusion compétitive (Hardin 1960) du fait de la présence en forte abondance de *C. intestinalis*, l'espèce congénère présentant des caractéristiques biologiques et un habitat similaire. Cette hypothèse est cependant peu vraisemblable au vu des données obtenues dans les 7 autres localités où *C. intestinalis* et *C. robusta* co-existent à micro-échelle (*i.e.* au sein d'un même cadrat), avec parfois de très fortes densités pour *C. intestinalis*. Cette dernière espèce est en effet, à l'exception du port de Perros-Guirec, toujours beaucoup plus abondante que sa congénère non-indigène dans les peuplements établis sous les pontons. L'absence d'exclusion compétitive ne veut pas dire que des processus de compétition n'ont pas lieu entre les deux espèces, ni que l'une ou l'autre ne puisse pas à terme monopoliser l'espace au détriment de la seconde. Seuls des suivis à long terme pourront rendre compte du devenir de ces deux espèces.

Lors des échantillonnages réalisés sur les peuplements d'ascidies, les espèces *C. intestinalis* et *C. robusta* ont été trouvées en moyenne ou forte abondance sous les pontons avec des valeurs maximales de densité observées en Octobre 2014 supérieures à 1000 individus par m² pour *C. robusta* et supérieures à 1300 individus par m² pour *C. intestinalis*. A cette même période, les autres ascidies solitaires (*i.e.* les ascidies indigènes, *Ascidiella aspersa* et *Phallusia mammillata*, et l'ascidie grégaire non-indigène, *Corella eumyota*) sont comparativement à *C. intestinalis* trouvées en abondance faible ou moyenne selon les ports (Figure 1.23). L'ascidie indigène *A. aspersa* est celle qui présente les valeurs les plus proches de *C. intestinalis* atteignant une densité moyenne de 480 (± 224 , écart type) individus par m² au port de Roscoff. Les valeurs sont bien inférieures pour les 2 autres espèces : les valeurs de densité les plus importantes sont 78 (± 51) individus par m² pour *P. mammillata* au port du Moulin Blanc et 143 (± 99) pour *C. eumyota* au port de l'Aber Wrach' (Figure 1.23). Il est intéressant de remarquer que c'est dans ce dernier port que *C. robusta* est absente, *C. intestinalis* faiblement abondante et que *C. eumyota* est l'espèce d'ascidie solitaire la plus abondante. Cela suggère que les conditions biotiques et abiotiques dans ce port ne sont que peu favorables aux deux espèces de ciones.

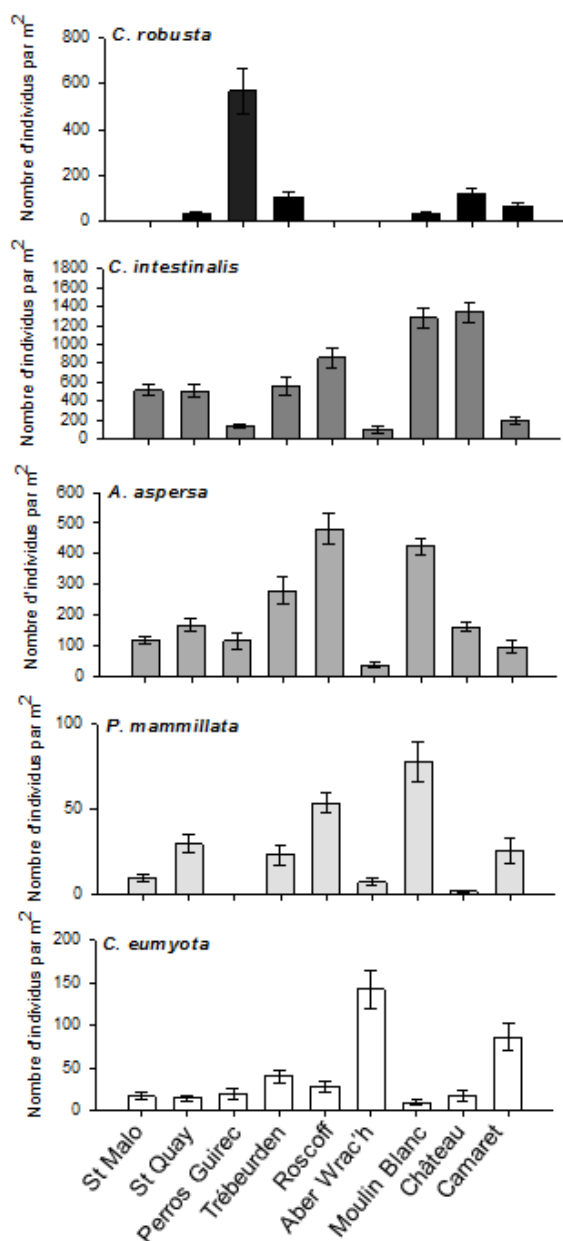


Figure 1.23. **Densité moyenne** (nombre d'individus par m² ± erreur standard) **des populations de différentes espèces d'ascidies solitaires**, indigènes (*C. intestinalis*, *A. aspersa*, *P. mammillata*) ou non-indigènes (*C. robusta*, *C. eumyota*). Ces espèces étaient parmi les plus abondantes **en Octobre 2014**. Il faut remarquer, sur ces graphiques, la différence d'échelle pour l'axe des ordonnées.

Les données de densité des populations de ciones obtenues dans notre étude sont relativement similaires à celles observées dans d'autres régions (Tableau 1.12). Par exemple pour *C. intestinalis*, des valeurs de densités supérieures à 1000 individus par m² ont été observées en Irlande (Costelloe *et al.* 1986) ou au Skagerrak (Lundalv & Christie 1986). On note cependant des valeurs de densité dépassant les 4000 individus par m² en Atlantique Nord-Ouest (i.e. île du Prince Edward; Ramsay *et al.* 2008), région pour laquelle le statut d'espèce de *C. intestinalis* est cryptogénique (Haydar 2012). Pour *C. robusta*, les valeurs de densité observées entre régions sont plus variables allant de 300 individus par m² dans les ports du Sud de la Californie (Rius *et al.* 2014b) à 3500 individus par m² en Mer Méditerranée (Caputi *et al.* 2015). Mais sur l'ensemble de ces études, on notera que les densités maximales atteintes sont souvent très élevées, ce qui fait de ces espèces, des espèces structurantes dans ces habitats portuaires, au moins sous les pontons.

La forte abondance de *C. robusta* et *C. intestinalis* mais également les variations d'abondance observées entre localités et entre dates d'observation se sont traduites par des contributions relatives importantes de ces deux espèces dans les Analyses en Coordonnées Principales réalisées (Figure 1.16). Les densités des deux espèces se sont également avérées très variables entre les deux périodes étudiées, mai et octobre 2014 (Tableau 1.8, Figure 1.17). Les caractéristiques environnementales et physiques des ports à ces deux périodes pourraient expliquer ces variations de distribution et d'abondance. Par exemple, une plus forte tolérance aux variations de température de l'espèce *C. robusta* pourrait expliquer sa présence en forte abondance sous les pontons du port de Perros Guirec. La tolérance à des températures élevées pourrait également expliquer les variations de densité observées entre les deux dates avec une augmentation plus importante de la densité relative de *C. robusta* par rapport à *C. intestinalis* entre les deux dates d'étude. Ces résultats pourraient également être juste le fait du hasard puisque nous n'avons que deux points d'observation, réalisés au cours d'une même année. Un autre type de facteurs pouvant jouer sur la distribution relative des deux espèces pourrait être une dynamique de sédentarisation des juvéniles différente entre les deux espèces, par exemple si la sédentarisation des juvéniles de *C. robusta* a lieu majoritairement durant l'été. Mais aucune

donnée documentant le cycle de vie et en particulier les modalités de recrutement des deux espèces n'est disponible dans la région de sympatrie pour supporter cette hypothèse.

Tableau 1.12. Inventaires bibliographiques des données de densités disponibles pour *C. robusta* et *C. intestinalis* dans différentes régions. Le statut (i.e. I : Indigène, NI : Non-Indigène, C : Cryptogénique) de ces deux espèces dans ces régions est indiqué.

Espèce	Localisation	Statut	Densité maximale (individus par m ²)	Type d'observation (fréquence, période)	Références
<i>Ciona robusta</i>					
	Mer Méditerranée	NI	3500 ind/m ²	Echantillonnage mensuel sur 10 ans (2002 - 2012) - 4 sites	Caputi <i>et al.</i> (2015)
	Pacifique NE	NI	300 ind/m ²	Echantillonnage mensuel sur un an (Juillet 2009 – Sept 2010) – 1 site	Rius <i>et al.</i> (2014)
	Atlantique SE	NI	2000 ind/m ²	2 échantillonnages ponctuels (Mai 1994 – Mars 2010) – 1 site	Rius <i>et al.</i> (2011)
	Atlantique SE	NI	640 ind/m ²	1 échantillonnage ponctuel (Octobre 2009) – 1 site	Rius <i>et al.</i> (2010)
	Pacifique NE	NI	>100 ind/m ²	Echantillonnage saisonnier (Spring – Fall entre 1994 et 1997) - 13 sites	Lambert et Lambert (1998)
	Manche	NI	560 ind/m ²	2 échantillonnages ponctuels (Mai Octobre 2014) – 9 sites	Présente étude
<i>Ciona intestinalis</i>					
	Mer du Nord	I	940 ind/m ²	Stéréophotographie sur transect tous les 4 mois entre novembre 1990 et 1991 – 1 site	Petersen & Riisgard (1992)
	Mer du Nord	I	450 ind/m ²	Stéréophotographie tous les 4 mois sur transect entre novembre 1990 et mars 1993 – 1 site	Petersen & Svane (1995)
	Mer du Nord	I	1379 ind/m ²	Stéréophotographie sur transect en septembre 1996 – 1 site	Petersen <i>et al.</i> (1997)
	Atlantique NE	I	>2000 ind/m ²	Collecteurs placés entre Février 1980 et Avril 1981 – 1 site	Costelloe <i>et al.</i> (1986)
	Mer du Nord	I	>1000 ind/m ²	Stéréophotographie sur cadrat tous les 4 mois entre 1969 et 1982	Lundalv & Christie (1986)
	Atlantique NO	C	>4000 ind/m ²	Collecteurs placés entre Juin et Octobre (2003 – 2006) – 1 site	Ramsay <i>et al.</i> (2008)
	Manche	I	1300 ind/m ²	2 échantillonnages ponctuels (Mai Octobre 2014) – 9 sites	Présente étude
<i>Ciona sp.</i>					
	Manche	-	2500 ind/m ²	Echantillonnage en Avril 1976 - 1 site	Koechlin (1977)

Ainsi à l'issue de ces études, nous pouvons attester de la syntopie de *C. robusta* et *C. intestinalis* dans de nombreux habitats portuaires bretons mais nous manquons de données concernant 1) le cycle de vie des deux espèces et 2) les variations saisonnières et annuelles de la distribution relative de ces deux espèces. Ces deux points font l'objet des chapitres 2 et 3. Ces connaissances sont nécessaires pour affiner notre caractérisation des conditions de la coexistence des deux espèces et ainsi déterminer dans quelle mesure des interactions compétitives et des hybridations pourraient jouer un rôle sur le devenir de ces deux espèces en milieu naturel.

Annexes

Chapitre 1 – Dans quel type de communautés sont établies les deux espèces au sein des habitats portuaires ?

Annexe 1.1. Contexte dans lequel les observations de *Ciona intestinalis* et *C. robusta* présentées en Figure 1.4 ont été menées

Num.	Localité	Contexte d'observation
1	Saint Malo	Suivi spatio-temporel des 2 espèces de <i>Ciona</i> sp. -> 1ere observation de <i>C. robusta</i> en automne 2013 ; suivi du peuplement d'ascidie; échantillonnage génétique ponctuel en plongée
2	Baie de St Brieuc	Echantillonnage des populations benthiques de <i>Crepidules</i> ; individus trouvés à l'intérieur de coquilles mortes
3	Baie de St Brieuc	Echantillonnage des populations benthiques de <i>Crepidules</i> ; individus trouvés à l'intérieur de coquilles mortes
4	Baie de St Brieuc	Echantillonnage des populations benthiques de <i>Crepidules</i> ; individus trouvés à l'intérieur de coquilles mortes
5	Saint Quay	Suivi spatio-temporel des 2 espèces de <i>Ciona</i> sp. ; suivi du peuplement d'ascidie; échantillonnage génétique ponctuel en plongée
6	Lézardrieux	Observation depuis les pontons
7	Perros Guirec	Suivi spatio-temporel des 2 espèces de <i>Ciona</i> sp. ; suivi du peuplement d'ascidie; échantillonnage génétique ponctuel en plongée
8	Trébeurden	Suivi spatio-temporel des 2 espèces de <i>Ciona</i> sp. ; suivi du peuplement d'ascidie; échantillonnage génétique ponctuel en plongée
9	Roscoff	Suivi spatio-temporel des 2 espèces de <i>Ciona</i> sp. ; RAS en plongée, suivi trimestriel de la diversité des communautés d'espèces sur les piliers et les pontons -> Disparition de <i>C. robusta</i> début 2013; suivi du peuplement d'ascidie; échantillonnage génétique ponctuel en plongée
10	Aber Wrac'h	Suivi spatio-temporel des 2 espèces de <i>Ciona</i> sp. ; suivi des communautés d'espèces de faune sessile et du peuplement d'ascidie; échantillonnage génétique ponctuel en plongée
11	Moulin Blanc (Brest)	Suivi spatio-temporel des 2 espèces de <i>Ciona</i> sp. ; Suivi mensuel de dynamique des populations ; suivi des communautés d'espèces de faune sessile et du peuplement d'ascidie ; échantillonnage génétique ponctuel en plongée
12	Château (Brest)	Suivi spatio-temporel des 2 espèces de <i>Ciona</i> sp. ; suivi des communautés d'espèces de faune sessile et du peuplement d'ascidie; échantillonnage génétique ponctuel en plongée
13	Camaret sur Mer	Suivi spatio-temporel des 2 espèces de <i>Ciona</i> sp. ; suivi des communautés d'espèces de faune sessile et du peuplement d'ascidie; échantillonnage génétique ponctuel en plongée
14	Morgat (Crozon)	RAS 2013 depuis les pontons ; échantillonnage génétique ponctuel en plongée
15	Concarneau	Suivi spatio-temporel des 2 espèces de <i>Ciona</i> sp. ; échantillonnage génétique ponctuel en plongée
16	Lorient	Echantillonnage génétique ponctuel en plongée
17	Quiberon	Suivi spatio-temporel des 2 espèces de <i>Ciona</i> sp. ; échantillonnage génétique ponctuel en plongée
18	Crouesty	RAS 2013 depuis les pontons; échantillonnage génétique ponctuel en plongée
19	Saint Vaast	Echantillonnage génétique ponctuel en plongée
20	Jersey	Echantillonnage génétique ponctuel en plongée
21	Ile d'Yeu	Observation depuis les pontons
22	La Rochelle	Echantillonnage génétique ponctuel (en surface)

Annexe 1.2. Liste initiale d'espèces utilisée pour caractériser les communautés de faune sessile dans les habitats portuaires bretons (projet Interreg IVa Marinexus)

N°Panel	Scorer
Marina	Position (Inner/Outer)
Date retrieved	Date scored
Relaxed Propylene phenoxetol ~ 20 min	Preserved 70% Ethanol ~ 10 min

Notes:

	First side				Second side			
	Specimen kept			↓	Specimen kept			↓
	Top	Understory	Total		Top	Understory	Total	
BARE SPACE								
<i>Ascidella aspersa</i>								
<i>Ascidia mentula</i>								
<i>Asterocarpa humilis</i>								
<i>Balanus crenatus</i>								
<i>Balanus perforatus</i>								
<i>Botrylloides 'diegensis'</i>								
<i>Botrylloides violaceus</i>								
<i>Botrylloides 'radiata'</i>								
<i>Botrylloides</i> sp. indet.								
<i>Botryllus schlosseri</i>								
<i>Botryllid</i> sp. indet.								
<i>Bugula neritina</i>								
<i>Bugula</i> sp. indet.								
<i>Celleporella hyalina</i>								
« <i>Ciona intestinalis</i> »								
<i>Clavelina lepadiformis</i>								
<i>Corella eumyota</i>								
<i>Cryptosula pallasiana</i>								
<i>Didemnum vexillum</i>								
<i>Diplosoma listerianum</i>								
<i>Electra pilosa</i>								
<i>Elminius modestus</i>								
<i>Leucosolenia</i> sp.								
<i>Molgula</i> sp.								
<i>Mytilus edu./gallo.</i>								
<i>Perophora japonica</i>								
<i>Phallusia mammillata</i>								
<i>Pomatoceros</i> sp.								
<i>Sabella</i> sp.								
<i>Scypha compressa</i>								
<i>Styela clava</i>								
<i>Sycon ciliatum</i>								
<i>Tricellaria inopinata</i>								
<i>Tubularia</i> sp. indet.								
<i>Watersipora subatra</i>								
Anomiidae indet.								
Didemnidae indet.								
Polyclinidae indet.								
Spirorbidae indet.								
Terebellid worms								
Unident .calc.worm tube								
Sponge indet								

Annexe 1.3. Informations utilisées pour déterminer le statut indigène, non-indigène ou cryptogénique des espèces de faunes sessiles identifiées
(hors *Ciona intestinalis* et *C. robusta* ; pour ces dernières voir l'introduction générale).

Sur la base des descriptions originales et de la distribution des espèces documentées notamment dans WoRMS (i.e. première description et/ou présente uniquement en Atlantique Nord-Est), 6 espèces ont été considérées comme indigènes en Manche occidentale: les ascidies *Ascidia mentula* Muller, 1776, *Asciidiella aspersa* (Muller, 1776), *Asciidiella scabra* (Muller, 1776), *Clavelina lepadiformis* (Muller, 1776) et *Phallusia mammillata* (Cuvier, 1815) ainsi que le bryzoaire, *Membraniporella nitida* (Johnston, 1838).

9 espèces ont été référencées comme non-indigènes :

Chordata

- *Asterocarpa humilis* (Heller, 1878) est une ascidie solitaire originaire de l'hémisphère Sud qui a été introduite récemment en Atlantique Nord-Est (i.e. première observation documentée en 2005 en Bretagne) et dont l'identification a été confirmée à l'aide d'outils moléculaires (Bishop et al. 2013).
- *Corella eumyota* Traustedt, 1882 est une ascidie grégaire largement distribuée dans l'hémisphère Sud. La première observation en Manche date du début des années 2000 (Lambert 2004). Cette espèce est largement répandue aujourd'hui de part et d'autre de la Manche (Bishop et al. 2015).
- *Didemnum vexillum* Kott, 2002 est une ascidie coloniale dont le statut taxonomique a été réévalué récemment (Lambert 2009). Cette espèce, considérée comme originaire du Japon a été documentée pour la première fois sur les côtes du Nord de la France à la fin des années 1990 et, au milieu des années 2000, au sud de l'Angleterre (références citées par Bishop et al. 2015).
- *Perophora japonica* Oka, 1927 est une ascidie coloniale originaire du Pacifique Nord-Est introduite sur les côtes du Nord de la France au début des années 1980 (Monniot & Monniot 1985, cité par Bishop et al. 2015). Sa démographie depuis son introduction a par ailleurs été étudiée à l'aide d'outils moléculaires dont les résultats obtenus suggèrent de multiples sources d'introduction en France (Pérez-Portela et al. 2012).
- *Styela clava* Herdman, 1881 est une ascidie solitaire originaire du Pacifique Nord-Est. Sa première observation en Manche date du début des années 1950 où elle aurait été introduite en Angleterre via les bateaux participant à la guerre de Corée (références citées par Dupont et al. (2010)).

Bryozoa

- *Bugula neritina* (Linnaeus, 1758) est un bryzoaire dressé cosmopolite dont la première observation date du début du 20^e siècle (Ryland et al. 2011). A l'exception de cette observation, sa présence n'a pas été documentée jusqu'à la fin des années 1990 (Ryland et al., 2011). Aujourd'hui cette espèce est largement répandue de part et d'autre de la Manche (Bishop et al., 2015).
- *Tricellaria inopinata* d'Hondt & Occhipinti Ambrogi, 1985 est un bryzoaire dressé introduit à la fin des années 1990 dans le sud de l'Angleterre. Cook et collaborateurs ont décrit sa rapide expansion le long des côtes de l'Atlantique Nord-Est en l'espace de 10 ans (Cook et al. 2013). Aujourd'hui cette espèce est répandue de part et d'autre de la Manche (Bishop et al. 2015).
- *Watersipora subatra* (Ortmann, 1890) est un bryzoaire encroutant, supposé originaire de Pacifique Sud-Est, dont la première observation en Manche date de la fin des années 1990 (Ryland et al. 2009), décrit alors comme *W. subtorquata* avant la révision de Vieira et al. (2014). A l'instar de *T. inopinata*, cette espèce est répandue de part et d'autre de la Manche (Bishop et al. 2015).

Arthropoda

- *Austrominius modestus* (Darwin, 1854) anciennement nommé *Elminius modestus* est un crustacé cirripède présentant une distribution cosmopolite. Il a été introduit en Europe dans les années 1940 probablement via le fouling sur les coques des bateaux (Bishop 1947).

D'autres espèces, pour lesquelles l'aire de distribution naturelle est plus ambiguë à définir ou pour lesquelles des complexes d'espèces ont été récemment décrits, ont été définies comme cryptogéniques (4 espèces) : le bryzoaire *Cryptosula pallasiana* (Moll, 1803), les ascidies coloniales *Botryllus schlosseri* (Pallas, 1766) (plusieurs clades identifiés en Atlantique Nord-Est; Bock *et al.* 2012), *Diplosoma listerianum* (Milne Edwards, 1841) (clade A présent en Atlantique Nord-Est; Perez-Portela *et al.* 2013) et l'éponge *Sycon ciliatum* (Fabricius, 1780).

Enfin d'autres taxons, pour lesquels l'identification n'a pas pu être réalisée jusqu'à l'espèce ne sont pas assignés à l'une ou l'autre des trois catégories. Ils ont été considérés au niveau du genre ou de la famille.

- Le genre *Botrylloides* regroupe majoritairement les ascidies coloniales introduites *Botrylloides violaceus* Oka, 1927 et *B. diegensis* Riiter & Forsyth, 1917 dont les premières observations sur les côtes de la Manche datent du début des années 2000 (références citées par Bishop *et al.* 2015). La distinction morphologique entre ces deux espèces est complexe et nécessite généralement une validation à l'aide de marqueurs moléculaires diagnostiques. Par ailleurs, l'espèce cryptogénique *B. leachi* (Savigny, 1816) est également présente en Atlantique Nord-Est mais est très peu observé dans les habitats portuaires bretons.

- Le genre *Bugulina* regroupe les bryozoaires *Bugulina fulva* (Ryland, 1960), et *Bugulina turbinata* (Alder, 1857) *Bugulina simplex* (Hincks, 1886) répertoriée majoritairement en Atlantique Nord-Est et en Mer Méditerranée. *B. simplex* est décrite comme une espèce non-indigène en Atlantique Nord-Est (Ryland *et al.* 2011). L'expertise taxonomique de ces trois espèces est complexe et peut nécessiter l'utilisation d'un microscope à balayage pour réaliser une identification à l'échelle spécifique.

- Le genre *Molgula* regroupe trois espèces d'ascidies grégaires, *Molgula socialis* Alder, 1863, *M. complanata* Alder & Hancock, 1870, *M. manhattensis* (De Kay, 1843), toutes les trois décrites en Atlantique Nord-Est. Le statut de d'espèce non-indigène de *M. manhattensis* est discuté depuis quelques années (Haydar *et al.* 2011).

- Le genre *Mytilus* regroupe les espèces nominales *Mytilus edulis* Linnaeus, 1758 et *M. galloprovincialis* Lamarck, 1819. La Bretagne est au cœur d'une zone hybride entre les deux espèces et l'identification des individus est complexe sans l'aide d'outils moléculaires.

- Le genre *Leucosolenia* regroupe les deux espèces *Leucosolenia botryoides* (Ellis & Solander, 1786) et *L. complicata* (Montagu, 1814), toutes les deux décrites exclusivement en Atlantique Nord-Est.

- Le genre *Spirobranchus* regroupe les espèces *Spirobranchus lamarcki* (Quatrefages, 1866) et *S. triqueter* (Linnaeus, 1758) toutes les deux considérées comme indigènes en Atlantique Nord-Est.

Annexe 1.4. **Faune sessile identifiée sur les dispositifs de recrutement récupérés après un an en Mars 2012, Aout 2012 et Mars 2013.** Le statut des espèces, tel que présenté dans l'Annexe 1.3, est indiqué : Ind pour Indigène, N-Ind pour non-indigène, Cryp pour cryptogénique et N-ass pour les espèces non-assignées (non identifiées au niveau de l'espèce). Les numéros 3 à 9 correspondent aux ports tels que numérotés dans la Figure 1.5. L'abondance des différents taxons est fonction du nombre de points sous lesquels ils ont été identifiés pour chaque plaque. La valeur moyenne (4 plaques) est ensuite calculée pour chaque site et date. Cette valeur est notée comme suit : (+) entre 1 et 10 points, (++) entre 11 et 50 points, (+++) au-delà de 50 points.

Espèce/genre/famille identifiée	Embranchement	Statut	Mars 2012							Aout 2012							Mars 2013						
			3	4	6	7	8	9		3	4	6	7	8	9		3	4	6	7	8	9	
<i>Austrominius modestus</i>	Arthropoda	N-Ind	+	+	+	+	+			+	+		+	+		+	+	+	++	+			
<i>Ascidia mentula</i>	Chordata	Ind												+	+			+					
<i>Ascidia aspersa</i>	Chordata	Ind	++	+++	++	+++	+++	+++		+++	+++	+++	+++	++		+	+++	++	+++	++	+++		
<i>Ascidia scabra</i>	Chordata	Ind			+	+	+	+					+				+		+	+	+	+	
<i>Asterocarpa humilis</i>	Chordata	N-Ind	+	++	++	++	+	+		++	++	+	++	++		+	+	++	+	+	+	+	
<i>Botrylloides</i> sp.	Chordata	N-ass	+	+	+	+		+			++	+	+	+			+	+	+	+	+		
<i>Botryllus schlosseri</i>	Chordata	Cryp	+	+	+	+	+	+		+	+	++	+	+				+	+	+			
<i>Bugula neritina</i>	Bryozoa	N-Ind	++	+	+		++	++		++	+	+	+	++	++		+	+	+	+	+	+	
<i>Bugulina</i> sp.	Bryozoa	N-ass	+	+	+	+		+					+		+		+	+	+	+	+	+	
<i>Ciona robusta</i>	Chordata	N-Ind								++					+				+				
<i>Ciona intestinalis</i>	Chordata	Ind	++	+++	+	+++	++	+++		+++	++	+++	++	++		+	+++	+	++	++	++	++	
<i>Clavelina lepadiformis</i>	Chordata	Ind			+	+	+	+				+	+	+			+	+				+	
<i>Corella eumyota</i>	Chordata	N-Ind	+	+	++	+	+	+		+	+	+++	+	+	++		+	+	++	++	+	+	
<i>Cryptosula pallasiana</i>	Bryozoa	Cryp	++	+		+	+			++	+	+	+	+			+	+	+	+	+		
<i>Didemnum vexillum</i>	Chordata	N-Ind		+		+							+				+	+	+	+			
<i>Diplosoma listerianum</i>	Chordata	Cryp	+	++	+	+	++	++		+	+	++	+	+	++		+	+	+	++	+	+	
<i>Leucosolenia</i> sp.	Porifera	N-ass	++	+	+	+	+	+		+		+					+	+	+		+	+	
<i>Membraniporella nitida</i>	Bryozoa	Ind						+							+							+	
<i>Molgula</i> sp.	Chordata	N-ass	++	+		+	+			+	+	+	+	+			+	+	+	+	+	+	
<i>Mytilus</i> sp.	Mollusca	N-ass						+							+				+	+	+	++	
<i>Perophora japonica</i>	Chordata	N-Ind		+	+					+	+	+	+		+		+	+	+	+			
<i>Phallusia mamillata</i>	Chordata	Ind		++	+++	++	++	++		++	+++	++	++	+++			+	++	++	+++	++		
<i>Sabella</i> sp.	Annelida	N-ass			+			+			+			+			+	+	+				
<i>Spirobranchus</i> sp.	Annelida	N-ass					+	+		+			+	+	+		+		+	+	+	+	
<i>Styela clava</i>	Chordata	N-Ind	+	+		+	+			+	+		++	+		++			+	+			
<i>Sycon ciliatum</i>	Porifera	Cryp	++	++	+	+	+	+		+	+	+	+	+	+		++	+	+	+	+	++	
<i>Tricellaria inopinata</i>	Bryozoa	N-Ind	+	+	+	++	+	+		+			+	+	+		+	+	+	++	+	+	
<i>Watersipora subatra</i>	Bryozoa	N-Ind	+	++		+	+			++	+		+	+	+		++	++		+	++		
Anomiidae indet.	Mollusca	N-ass				+		+		+		+	+		+		+					+	
Didemnidae indet.	Chordata	N-ass	+	++	+	+	++	+		++	+	++	++	++			+	++	+	+	+	+	
Polyclinidae indet.	Chordata	N-ass		+			+	+		+		+	+	+			+	+	+	+	+	+	
Spirorbidae indet.	Annelida	N-ass	++	+			+	+		++	+		+	+	+		+	+	+		+		
Styelidae indet.	Chordata	N-ass		+		+	+	+		+	+								+	+	+		
Porifera indet	Porifera	N-ass	++	+	+	+	+	+		++		+	+	+	+		++		+	+	+	+	

Annexe 1.5. **Ascidies identifiées dans les récoltes réalisées à partir de quadrats en Mai 2014 et Octobre 2014.** Le statut des espèces, tel que présenté dans l'Annexe 1.3, est indiqué : Ind pour Indigène, N-Ind pour non-indigène, Cryp pour cryptogénique et N-ass pour les espèces non-assignées (non identifiées au niveau de l'espèce). Les numéros 1 à 9 correspondent aux ports tels que numérotés dans la Figure 1.5. L'abondance (échelle semi-quantitative) des différents taxons est moyennée sur l'ensemble des 3 cadrats étudiés pour chaque site et date. La valeur moyenne est notée comme suit : (+) entre 0 et 1, (++) entre 1 et 2, (+++) au-delà de 2. A noter que pour le port n°5 (Roscoff), en mai 2014, seules les données d'abondance de *C. intestinalis* et *C. robusta* ont été obtenues.

Espèce/genre/famille d'ascidies identifiées	Statut	Mai 2014									Octobre 2014								
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	1	2	3	4	5	6	7	8	9
<i>Ascidia mentula</i>	Ind					-								+			+		
<i>Ascidella aspersa</i>	Ind	++	++	++	+++	-		+	++	++	++	++	++	+++	+++	++	+++	++	++
<i>Ascidella scabra</i>	Ind	+				-	+								+	+	+	+	+
<i>Asterocarpa humilis</i>	N-Ind	++	+	+	++	-				+	+		+	+	+	+	+		+
<i>Botrylloides</i> sp.	N-ass	++	++	+	+	-	++	++	+	+	+	++	+	+	+	++	+	+	+
<i>Botryllus schlosseri</i>	Cryp	+		+	+	-	++	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Ciona robusta</i>	N-Ind		+	+	+				+	+	+	++	+++	++			+	++	++
<i>Ciona intestinalis</i>	Ind	++	++	++	+++	++		++	+++	++	+++	+++	++	+++	+++	++	+++	+++	++
<i>Clavelina lepadiformis</i>	Ind	++	++		+	-	+++	++		+	+	+	+	+	+	+	+	+	
<i>Corella eumyota</i>	N-Ind	+	+	++	++	-	++		+	++	+	+	+	++	++	++	+	+	++
<i>Didemnum vexillum</i>	N-Ind	+	+	+	+	-	+	+		+	+	+	+	+	+	+	+		+
<i>Diplosoma listerianum</i>	Cryp	+	++	+		-			+	+	+	+	+	+	+	+	+		+
<i>Molgula</i> sp.	N-ass	+	+	+++	+	-	+	++	+	+	+	+	++	+	+		+		+
<i>Perophora japonica</i>	N-Ind	++	+	+	++	-	+	+		+	+	+	+	+	+	+	+		+
<i>Phallusia mammillata</i>	Ind	+	+		+	-				+	+	++		+	++	+	++	+	+
<i>Styela clava</i>	N-Ind	+	+	+	+	-	+	++	+	+	+	+	+	+		+	+	+	+
Polyclinidae indet.	N-ass	+	+	+	+	-	+	+	+	+	++	++	+	+	+	++	+	+	+
Didemnidae indet.	N-ass	+	+		+	-				+	+	+	+	+	+	+	+		++
Styelidae indet.	N-ass	+	+			-		+		+						+			

Annexe 1.6. **Contribution des différentes espèces** à l'analyse en coordonnées principales (PCoA) présenté en Figure 1.13 montrant la différenciation sur les deux axes principaux (PCO1 et PCO2) des communautés d'espèces de faune sessile en fonction des dates de récupérations des plaques et des ports suivis.

	PCO1	PCO2
% de variance expliquée	39.30%	12.20%
Contribution des variables (%)		
<i>Austrominius modestus</i>	0.03%	3.76%
<i>Ascidia mentula</i>	0.99%	2.33%
<i>Ascidella aspersa</i>	4.53%	4.28%
<i>Ascidella scabra</i>	1.69%	0.36%
<i>Asterocarpa humilis</i>	3.62%	2.35%
<i>Botrylloides</i> sp.	2.48%	3.54%
<i>Botryllus schlosseri</i>	3.08%	4.19%
<i>Bugula neritina</i>	2.54%	1.65%
<i>Bugulina</i> sp.	0.02%	3.83%
<i>Ciona robusta</i>	2.09%	5.55%
<i>Ciona intestinalis</i>	2.30%	7.88%
<i>Clavelina lepadiformis</i>	3.33%	6.28%
<i>Corella eumyota</i>	4.07%	4.23%
<i>Cryptosula pallasiana</i>	9.34%	0.26%
<i>Didemnum vexillum</i>	0.93%	0.24%
<i>Diplosoma listerianum</i>	2.73%	2.93%
<i>Leucosolenia</i> sp.	3.13%	4.38%
<i>Membraniporella nitida</i>	1.27%	4.75%
<i>Molgula</i> sp.	0.05%	1.62%
<i>Mytilus</i> sp.	0.14%	3.86%
<i>Perophora japonica</i>	2.48%	1.96%
<i>Phallusia mammillata</i>	4.27%	4.34%
<i>Spirobranchus</i> indet.	1.15%	1.00%
<i>Sabella</i> sp.	1.85%	3.59%
<i>Styela clava</i>	4.96%	0.64%
<i>Sycon ciliatum</i>	2.79%	4.32%
<i>Tricellaria inopinata</i>	1.12%	2.29%
<i>Watersipora subatra</i>	8.35%	1.12%
Anomiidae indet.	0.91%	5.80%
Didemnidae indet.	4.10%	0.68%
Polyclinidae indet.	1.59%	2.97%
Spirorbidae indet.	9.70%	0.26%
Sponge indet	7.93%	2.44%
Styelidae indet.	0.42%	0.33%

Annexe 1.7. **Contribution des différentes espèces d'ascidies** à l'analyse en coordonnées principales (PCoA) présenté en Figure 1.16 montrant la différenciation sur les deux axes principaux (PCO1 et PCO2) des peuplements d'ascidies en fonction des dates d'échantillonnage et des ports suivis.

	PCO1	PCO2
% de variance expliqué	28.70%	20.30%
Contribution des variables (%)		
<i>Ascidia mentula</i>	1.43%	1.33%
<i>Ascidella aspersa</i>	13.76%	4.13%
<i>Ascidella scabra</i>	6.18%	0.16%
<i>Asterocarpa humilis</i>	3.03%	7.09%
<i>Botrylloides</i> sp.	7.62%	8.43%
<i>Botryllus schlosseri</i>	3.89%	2.96%
<i>Ciona robusta</i>	10.38%	3.77%
<i>Ciona intestinalis</i>	14.13%	2.00%
<i>Clavelina lepadiformis</i>	14.32%	3.84%
<i>Corella eumyota</i>	1.84%	9.60%
<i>Didemnum vexillum</i>	1.68%	2.75%
<i>Diplosoma listerianum</i>	0.44%	5.04%
<i>Molgula</i> sp.	3.12%	15.92%
<i>Perophora japonica</i>	1.85%	5.86%
<i>Phallusia mammillata</i>	5.59%	9.44%
<i>Styela clava</i>	0.61%	10.12%
Styelidae indet.	2.11%	1.66%
Polyclinidae indet.	5.62%	0.13%
Didemnidae indet.	2.41%	5.76%

Annexe 1.8. Chapitre de livre présentant brièvement quelques méthodes d'évaluation semi-quantitative et quantitative des espèces non-indigènes dans les habitats portuaires par l'utilisation de la plongée scientifique

Pour publication dans « *Methods in Scientific Diving* », ed. KFT
(Livre en préparation, chapitre soumis et accepté par l'éditeur)

Baseline survey of non-indigenous species in marinas and harbours

Frédérique Viard^{1,2}, Sarah Bouchemousse^{1,2}, Laurent Lévêque^{1,3}

¹ Sorbonne Universités, UPMC Univ Paris 06, Station Biologique de Roscoff, 29680 Roscoff, France

² CNRS, UMR 7144 AD2M, Divco team, Station Biologique de Roscoff, 29680 Roscoff, France

³ CNRS, FR 2424, Service Mer & Observation, Station Biologique de Roscoff, 29680 Roscoff, France

Contact author: Frédérique Viard ; e-mail: viard@sb-roscoff.fr

Since the last century, marine species have been displaced at an increasing rate from their native range to new and often distant areas, through human-mediated transports and commercial exchanges, like maritime traffic or aquaculture trade. These species, named non-indigenous species (NIS), represent a serious threat to coastal habitats and ecosystem services (Molnar *et al.*, 2008). Marinas and harbours display a large number of taxonomically diverse NIS (e.g. Cohen *et al.*, 2005). They are primary sites of introduction: maritime traffic is the major introduction vector (Molnar *et al.* 2008). Fouling species are transported on the hulls and fouling or pelagic organisms in ballast tanks (Gollasch, 2002; Coutts *et al.*, 2003; Davidson *et al.*, 2008; Seebens *et al.*, 2013). Monitoring these sites is thus of primary importance for early warning and preventing further spread of NIS in surrounding natural habitats and other neighbouring marinas and harbours (*i.e.* step-by-step spreading through regional boating (Mineur *et al.*, 2008; Clarke Murray *et al.*, 2011)). Monitoring and survey can support managers of coastal areas particularly in terms of conservation purposes. Several studies showed that artificial habitats are not a surrogate of natural rocky habitats. They display particular species assemblages making their survey of interest also for community ecologists and evolutionary biologists (Airoidi & Bulleri (2011) and references therein).

Monitoring and surveys of marinas and human-made habitats for recording NIS can be done in different ways (see Campbell *et al.*, 2007, for a review). In the case of harbours, RASs are often implemented by a group of taxonomic experts to record the name and abundance using a semi-quantitative scale in a time-limited visit (see Arenas *et al.* (2006), Cohen *et al.* (2005) and Bishop *et al.* (2014) for protocols and examples). But they are carried out from the surface (pontoons) and thus do not address the whole range of habitats occurring in one harbour (e.g. lower side of pontoons, pilings, quays, jetties, hulls, etc.) - that all imposed some specific environmental constraints on the species assemblages (e.g. limited light under pontoons; vertical surface on pilings, etc.). Also, passive sampling methods using experimental plates deployed at a given depth for a given amount of time (e.g. Connell (2000)) have been used. They are valuable tools for comparative analyses

across sites but, since the colonization is time-limited and the panels made of specific substrates, they may not be representative of the true established community. Though SCUBA diving potentially allows an unbiased access to a variety of micro-habitats for benthic communities in marinas to carry out quantitative surveys (based on destructive quadrants) or semi-quantitative surveys (using Underwater Visual Census methods), only a small number of protocols using diving have been set-up for NIS port surveys. Two protocols integrating diving methods are however helpful in describing the procedures from the field to the laboratory treatment: the CRIMP protocol (Centre for Research on Introduced Marine Pest (Hewitt & Martin, 1996; Hewitt & Martin, 2001)) developed by the CSIRO in Australia and a related protocol, the NIWA protocol, implemented in New-Zealand (Gust *et al.*, 2001; Inglis *et al.*, 2005). As destructive quadrants are used, results do not rely on the taxonomic expertise of the field team: the species identification is made back to the lab which allows more precision in the taxonomic assignment as compared to RAS. Sampling effort (number of visits, of locations, of replicates) can be adapted depending on the question to be specifically addressed.

For example, based on NIWA protocols, we set up a survey to look at the speed of the establishment of NIS and native species in a newly built marina in the Bay of Morlaix, located inside a Natura 2000 site. The work has been focused on pilings and pontoons in two areas of the marina, in the inner part where current velocity is low and in the outer part suffering from important currents. Surveys started from the very beginning of the build-up of the marina (2011) and repeated every three month. A team of three divers was operating on site to take pictures and collect 20 x 25 cm quadrats into a net with a mesh size of ca. 1 mm (Figure 1). Back to the laboratory, for each quadrat, every specimen was identified; for solitary taxa, the number of specimens was recorded and for colonial taxa, a 4-level score for abundance was given. This survey was shown effective to get evidences for the rapid establishment of 13 sessile NIS and quantify their abundance over time (see Figure 2 for an example with sessile animal NIS; Bouchemousse *et al.* in prep.).



Figure 1. Quadrats survey along pilings by a team of three divers – Picture: Wilfried Thomas©Station Biologique Roscoff.

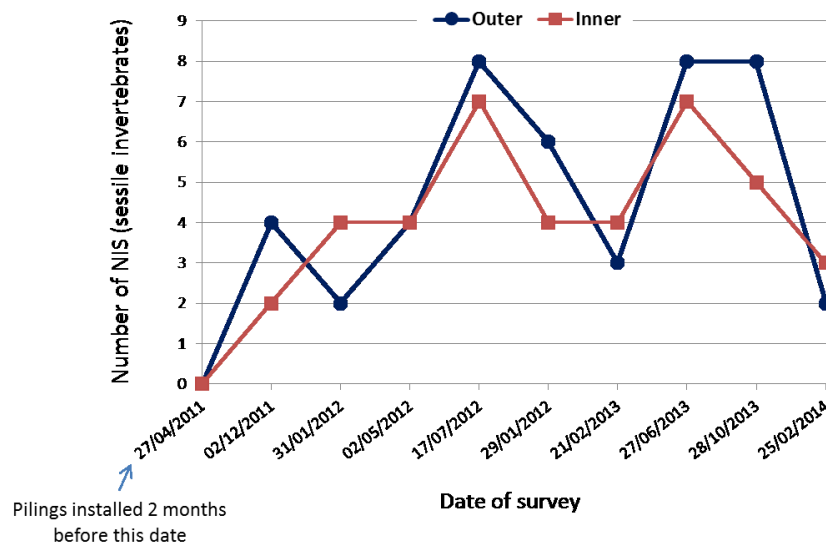


Figure 2. Number of non-indigenous sessile animals (NIS) recorded using quadrat-based monitoring on pilings in the inner and the outer part of one newly built marina.

Additionally, we also adapted Rapid Assessment Surveys methods to be implemented by SCUBA diving. To allow comparisons, semi-quantitative records of abundance of the organisms are carried out in a defined limited time – as in the RASs from the surface – in a number of places within the port (under pontoons, quays, piling, etc.). For safety reasons and efficiency, dive-time was limited to 30 minutes for each micro-habitats surveyed. The most important change as compared to the “classical” RASs methods is that, before diving operations, a closed list of species was established, based on previous knowledge on the occurrence of NIS in the region

(including from the study described above) and knowledge-level of the divers who record the species on-site (no specimens are brought back to the laboratory except if some unusual observations are made or to confirm species identification). Note that for surveys carried out by large group of divers with low taxonomic expertise (e.g. as part of science citizen program) it can be simply based on a few conspicuous NIS known to be possibly invasive.

The main target for the diver is to record the species from the list with a semi-quantitative-

scale for their abundance. The scale was set to 4 levels for sake of accuracy (Absent, Rare, Common, and Abundant). Additional taxa (especially NIS) can obviously be recorded during the survey provided that samples are taken back to the laboratory to confirm identification - thus allowing early detection of NIS and improvement of the list between surveys. A minimum of two divers are doing the same dive and make independent records. A third diver can take pictures (possibly using a frame) to confirm and / or complement observations. After the dive, a synthesis sheet is made. Figure 3 is providing an example of the outcome of such a Diving-RAS showing contrasted spatial occupancy by two NIS out of 17 (animals and macro-algae), one invasive newly discovered tunicate *Asterocarpa humilis* (Bishop *et al.*, 2013) and the cosmopolitan bryozoan *Bugula neritina*, in the one-year old marina in Roscoff (Brittany, France). This result exemplifies the primary aim of such diving-RAS, *i.e.* to locate a NIS in the variety of micro-niches. It is also easy to implement for temporal survey, *i.e.* examine the changes in abundance over time.

Both approaches thus appear to be very complementary for the assessment of NIS presence and abundance in ports. Quantitative surveys using quadrants have proved to be more efficient to detect NIS (Campbell *et al.*, 2007), while RAS methods are less demanding in term of resources and time, and easier to implement at larger spatio-temporal scale. For example, in our case, the quadrat-based survey was more reliable for the detection of the introduced and cryptic species *Ciona intestinalis* type A as compared to its native congener (*C. intestinalis* type B), the accurate distinction between both relying mainly on internal characters (Sato *et al.* 2012). On the other hand, the RAS allowed for the early detection of the Asian kelp *Undaria pinnatifida*, invasive in many areas in Brittany (Grulois *et al.* 2011), in the surveyed marina: we never sampled this kelp in the quadrats but observed it during RAS in a remote part of the marina. Altogether, quadrat-based surveys can be used for baseline surveys and RAS for large-scale spatial surveys and lighter long-term monitoring purposes.

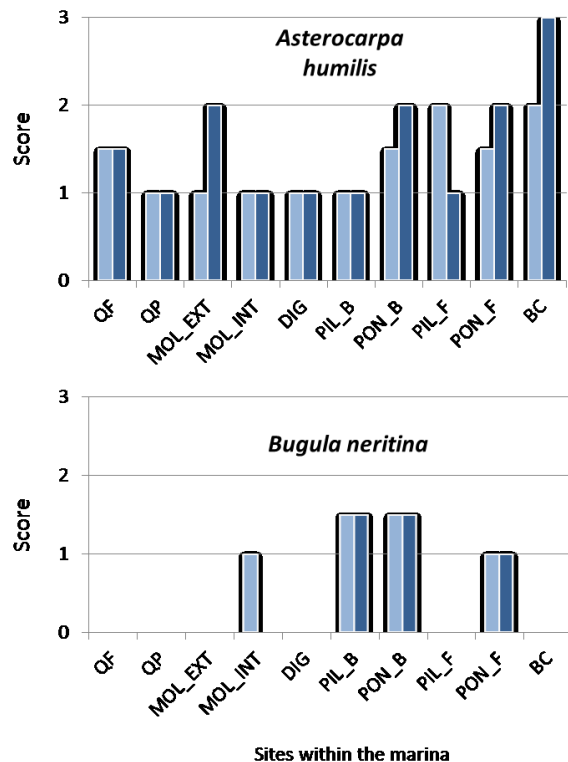


Figure 3. Space occupancy by two non-indigenous invertebrates, one tunicate (top) and one bryozoan (bottom) in 10 sites within a one-year old marina in Brittany, by means of Rapid Assessment Surveys (RAS). RAS were repeated in each location in spring (light blue) and fall (dark blue). Semi-quantitative data are used to determine the abundance (score on the y-axis) (source: Bouchemousse *et al.* in prep).

There is a large set of human-made habitats likely to be colonized by NIS. We here focused on marinas and harbours but any artificial habitats including wrecks, ship hulls and artificial reefs, some of them being created to enhance recreational scuba-diving, are also putative habitats for NIS. This is exemplified with the invasive tunicate *Styela clava* which was recorded on the hull of the wreck of HMS Scylla, deliberately sunk in March 2004 as an artificial reef (cited in Dupont *et al.*, 2009). RAS and quadrat-based surveys can also be achieved on ship hulls (Figure 4). For instance, quadrat samples and video transects implemented by diving were recently used to estimate the

abundance of native and non-native invertebrates on the hulls of 40 commercial transoceanic vessels in the Port of Halifax and Vancouver (Sylvester *et al.*, 2011). These important dataset, combined with sampling in the sampled harbours, allowed determining among others the risks for subsequent colonization by new NIS in the studied areas. Further studies are needed to get a comprehensive view of the role of human-made habitats as biodiversity drivers, in particular regarding NIS. Among the methods to be implemented for such studies SCUBA diving using RAS and quadrat-based surveys, appears to be both efficient and necessary for sampling specific habitats.

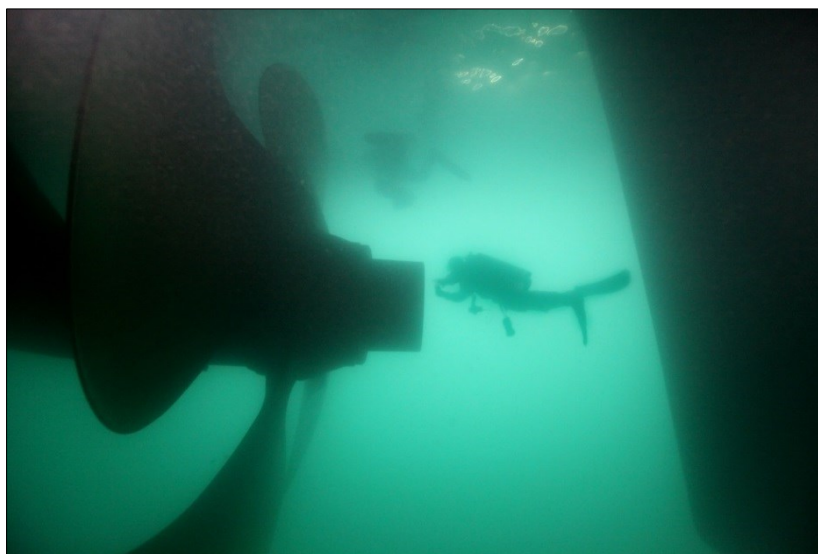


Figure 4. Use of diving for quadrat-based survey and RAS on ship hulls, here on a Ferry used for regional passengers transports. Picture: Wilfried Thomas©Station Biologique Roscoff.

Acknowledgments: The authors are grateful to John Bishop for introducing them to RAS and subsequent stimulating discussions about RAS implementations and limitations. The work carried out in the Roscoff marina was supported by the

project INTERREG IVA Marinexus and the ANR project HYSEA (no. ANR-12-BSV7-0011). S.B. benefited from a PhD grant by the Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche.

References

- Airolidi, L. & Bulleri, F. (2011) Anthropogenic disturbance can determine the magnitude of opportunistic species responses on marine urban infrastructures. *PLoS ONE*, 6 (8), e22985.
- Arenas, F., Bishop, J. D. D., Carlton, J. T., Dyrinda, P. J., Farnham, W. F., Gonzalez, D. J., Jacobs, M. W., Lambert, C., Lambert, G., Nielsen, S. E., Pederson, J. A., Porter, J. S., Ward, S. & Wood, C. A. (2006) Alien species and other notable records from a rapid assessment survey of marinas on the south coast of England. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 86, 1329-1337.
- Bishop, J.D.D., Roby, C., Yunnies, A.L.E., Wood, C.W., Lévêque, L., Turon, X. & Viard, F. (2013) The Southern Hemisphere ascidian *Asterocarpa humilis* is unrecognised but widely established in NW France and Great Britain. *Biological Invasions*, 15 (2), 253-260.
- Campbell, M. L., Gould, B. Hewitt, C. L. (2007). Survey evaluations to assess marine bioinvasions. *Marine Pollution Bulletin*, 55 : 360-378.
- Clarke Murray, C., Pakhomov, E.A. & Theriault, T.W. (2011) Recreational boating: a large unregulated vector transporting marine invasive species. *Diversity and Distributions*, 17 (6), 1161-1172.
- Cohen, A.N., Harris, L.H., Bingham, B.L., Carlton, J.T., Chapman, J.W., Lambert, C.C., G., L., Ljubenkov, J.C., Murray, S.N., Rao, L.C., Reardon, K. & Schwindt, E. (2005) Rapid Assessment Survey for exotic organisms in southern California bays and harbors, and abundance in port and non-port areas. *Biological Invasions*, 7, 995-1002.
- Connell, S.D. (2000) Floating pontoons create novel habitats for subtidal epibiota. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 247 (2), 183-194.
- Coutts, A.D.M., Moore, K.M. & Hewitt, C.L. (2003) Ships'sea-chests: an overlooked transfer mechanism for non-indigenous marine species? *Marine Pollution Bulletin*, 46, 1504-1515.
- Davidson, I.C., McCann, L.D., Fofonoff, P.W., Sytsma, M.D. & Ruiz, G.M. (2008) The potential for hull-mediated species transfers by obsolete ships on their final voyages. *Diversity and Distributions*, 14 (3), 518-529.
- Dupont, L., Viard, F., Dowell, M.J., Wood, C. & Bishop, J.D.D. (2009) Fine- and regional-scale genetic structure of the exotic ascidian *Styela clava* (Tunicata) in southwest England, 50 years after its introduction. *Molecular Ecology*, 18 (3), 442-453.
- Gollasch, S. (2002) Life in ballast tanks. Invasive species of Europe - Distribution, impact and management (ed. by E. Lepp  koski, S. Gollasch and S. Olenin), pp. 217-231. Dordrecht/Boston/London, Kluwer Academic Publishers.
- Grulois, D., Leveque, L. & Viard, F. (2011) Mosaic genetic structure and sustainable establishment of the invasive kelp *Undaria pinnatifida* within a bay (Bay of St-Malo, Brittany). *Cahiers De Biologie Marine*, 52 (4), 485-498.
- Gust, N., Inglis, G. & Hayden, B. (2001) Design of baseline surveys for exotic marine organisms. ed. F.R.R.F.M.P. Zbs2000/04. Christchurch, National Institute of Water and Atmospheric Research.
- Hewitt, C. & Martin, R. (1996) Port surveys for introduced marine species – background considerations and sampling protocols. In: CRIMP technical report no 4. Hobart, CSIRO Division of Fisheries.
- Hewitt, C.L. & Martin, R.B. (2001) Revised protocols for port surveys for introduced marine species: survey design, sampling protocols and specimen handling. In: CRIMP Technical Report, p. 46. CSIRO Division of Marine REsearch, Hobart, Australia.
- Inglis, G., Gust, N., Fitridge, I., Floerl, O., Woods, C., Hayden, B. & Fenwick, G. (2005) Opuia Marina-Baseline survey for non-indigenous marine species In: Biosecurity New Zealand Technical Paper No: 2005/14.
- Mineur, F., Johnson, M. & Maggs, C. (2008) Macroalgal introductions by hull fouling on recreational vessels: seaweeds and sailors. *Environmental Management*, 42 (4), 667-676.
- Molnar, J.L., Gamboa, R.L., Revenga, C. & Spalding, M.D. (2008) Assessing the global threat of invasive species to marine biodiversity. *Frontiers in Ecology and the Environment*, 6 (9), 485-492.
- Sato, A., Satoh, N. & Bishop, J.D. (2012) Field identification of 'types' A and B of the ascidian *Ciona intestinalis* in a region of sympatry. *Marine Biology*, 159 (7), 1611-1619.
- Seebens, H., Gastner, M.T. & Blasius, B. (2013) The risk of marine bioinvasion caused by global shipping. *Ecology Letters*, 16 (6), 782-790.
- Sylvester, F., Kalaci, O., Leung, B., Lacoursi  re-Roussel, A., Murray, C.C., Choi, F.M., Bravo, M.A., Theriault, T.W. & MacIsaac, H.J. (2011) Hull fouling as an invasion vector: can simple models explain a complex problem? *Journal of Applied Ecology*, 48 (2), 415-423.

- Chapitre 2 -

La dynamique des populations est-elle similaire pour les deux espèces ?

I. Contexte et synopsis de l'étude

La dernière étude présentée dans le chapitre précédent a mis en évidence que *Ciona intestinalis* est, par rapport à *C. robusta*, l'espèce la plus abondante dans tous les ports, à l'exception de Perros Guirec. Par ailleurs, une importante variation de la densité des populations de *C. robusta* et *C. intestinalis* a été observée entre les deux dates d'observation (i.e. mai et octobre 2014) et plus particulièrement pour *C. robusta*. Cette augmentation relative plus importante de la densité de l'espèce non-indigène pourrait être le résultat de conditions environnementales plus favorables à cette espèce, notamment des températures plus élevées durant les périodes estivales et automnales. Une autre hypothèse pourrait être une dynamique de sédentarisation des juvéniles différentes entre les deux espèces. Par exemple, une sédentarisation des juvéniles de *C. robusta* ayant lieu majoritairement durant l'été pourrait expliquer la plus forte augmentation de la densité de *C. robusta* en octobre par rapport à *C. intestinalis*. Par ailleurs, les espèces du genre *Ciona* présentent une phase larvaire mobile dont la durée est estimée entre 6 et 36h dans les eaux britanniques (Millar 1952) et des taux de croissance rapide (le stade adulte est atteint en moins de 2 mois en laboratoire, à 17°C). De ce fait, un décalage temporel du recrutement des juvéniles entre les deux espèces pourrait participer à la monopolisation de l'espace disponible pour le recrutement par l'espèce ayant une reproduction plus précoce. Cependant, aucune donnée documentant le cycle de vie et en particulier les modalités de recrutement des deux espèces n'est disponible dans la région de sympatrie pour vérifier ces hypothèses.

Cette partie du travail de thèse s'est focalisée sur l'étude de la dynamique de sédentarisation des juvéniles chez *C. intestinalis* et *C. robusta*, en cherchant plus spécifiquement à 1) documenter le cycle de vie des deux espèces *in situ* (moment de la sédentarisation des juvéniles, nombre d'évènements de recrutement annuel, etc.), 2) établir s'il existe un décalage dans la période de sédentarisation des juvéniles entre les deux espèces et 3) évaluer l'abondance relative des deux espèces à ce stade précoce du cycle de vie. Cette étude fait l'objet d'un article en préparation pour la revue *Biological Invasions*, présenté en section II de ce chapitre et résumé ci-dessous.

Pour répondre aux objectifs listés ci-dessus, nous avons mené une approche expérimentale *in situ* en utilisant des plaques de recrutement de type Correx immergées sous les pontons de quatre ports pour lesquels la syntopie entre les espèces avait été documentée dans nos autres études (chap.1 et chap.3) et qui étaient représentatives de situations différentes concernant l'abondance relative des deux espèces au stade adulte. Les localités choisies (Figure

2.1) étaient ainsi les ports de Moulin Blanc et de Roscoff caractérisés par une faible abondance relative de *C. robusta*, et les ports de Château et de Trébeurden, caractérisés par une plus grande abondance relative de l'espèce non-indigène.

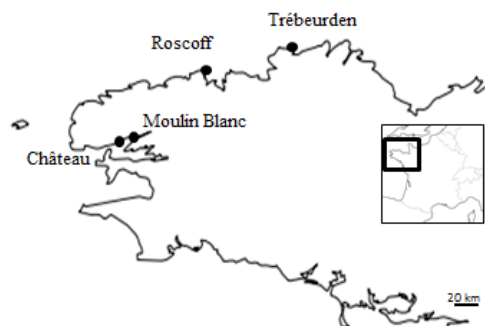


Figure 2.1. Site d'étude de la sédentarisation des juvéniles de *C. robusta* et *C. intestinalis*

Les plaques de recrutement utilisées présentent une face horizontale de 15 x 15 cm offrant un substrat similaire en termes d'exposition à la lumière que celui des pontons. Trois plaques ont été placées sous un ponton (Figure 2.2.A) dans chacun des 4 ports en Février 2013 puis relevées et remplacées par une nouvelle plaque vierge un mois plus tard. L'opération a été répétée entre Février 2013 et Février 2015 (i.e. dernier relevé en Mars 2015). Pour le port du Moulin Blanc, deux années supplémentaires de données ont été obtenus, l'expérience ayant été démarrée deux ans plus tôt dans cette localité. Sur chacune des plaques récupérées, le nombre de juvéniles de *Ciona* a été compté sur la face horizontale (Figure 2.2.B) sous loupe binoculaire, grâce à une grille de comptage comportant 100 cellules de 1.21 cm². Ce nombre a été rapporté à la surface pour obtenir une valeur de densité (nombre de juvéniles par dm²). Les ciones, âgées au maximum de 3-4 semaines, sont difficiles à identifier au niveau spécifique, en particulier lors de comptage rapides tels que ceux que nous faisons (la totalité des plaques étant relevée à 1-2 jours d'intervalle et traitée en 24-48h). Aussi pour évaluer l'abondance mensuelle des deux espèces, un sous échantillonnage d'environ 20-30 juvéniles a été effectué sur chacune des plaques afin de les identifier avec un marqueur mitochondrial diagnostique analysé par PCR-RFLP (COX1 ; Nydam & Harrison 2007). Les proportions relatives des deux espèces ont été obtenues par plaque et par mois grâce à cette identification moléculaire. Rapportées aux données de densité obtenues pour le taxon *Ciona*, nous avons ainsi obtenu une estimation de la densité de *C. robusta* et *C. intestinalis* pour chacune des plaques.

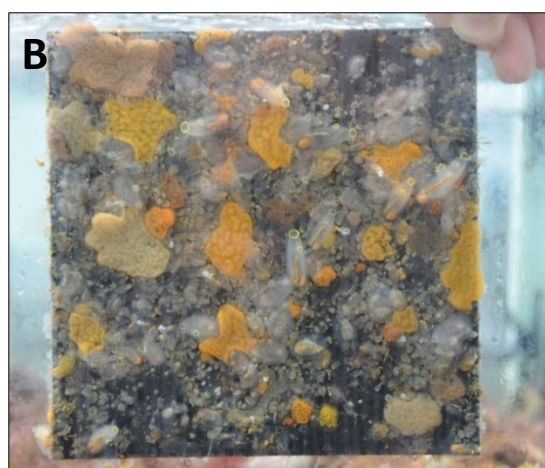
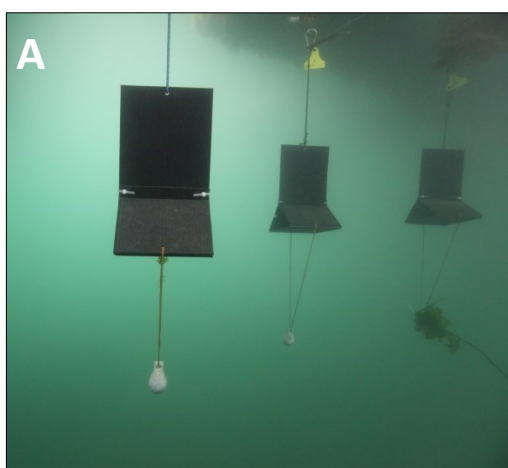


Figure 2.2. (A) Photographie des 3 plaques installées sous un ponton du port de Roscoff, pour étudier la sédentarisation des larves d'invertébrés benthiques ©Wilfried Thomas, Station Biologique de Roscoff. (B) Colonisation observée après un mois, sur l'une des plaques relevée en juillet 2014 dans le port du Moulin Blanc (on remarquera que cette période est particulièrement favorable à l'établissement rapide de nombreuses espèces d'ascidies, notamment coloniales). ©Laurent Lévêque, Station Biologique de Roscoff.

Un résultat inattendu à la suite des identifications moléculaires est qu'aucun juvénile de *C. robusta* n'a été identifié sur les plaques immergées dans le port de Roscoff, alors que des adultes y avaient été observés fin 2012 (cf. chap. 3). Il s'avère qu'à partir de 2013, cette espèce semble avoir disparu de cette localité (cf. résultats chap. 3). En revanche, les deux espèces ont bien été identifiées dans les 3 autres ports étudiés. Afin de déterminer s'il existait un ou plusieurs pics de sédentarisation au cours d'une année et pour déterminer le moment de la sédentarisation, nous avons utilisé une approche par décomposition modale de la courbe de distribution mensuelle des densités de juvéniles de ciones. A l'issue de ces analyses, deux périodes annuelles de sédentarisation ont été clairement identifiées, et ce pour chacune des deux espèces (Figure 2.3.A). La première période de sédentarisation a lieu entre mai et août (période printanière-estivale) et la seconde entre septembre et novembre (période automnale). Les mêmes résultats ont été obtenus sur une plus longue période d'observation (4 ans) au Moulin-Blanc.

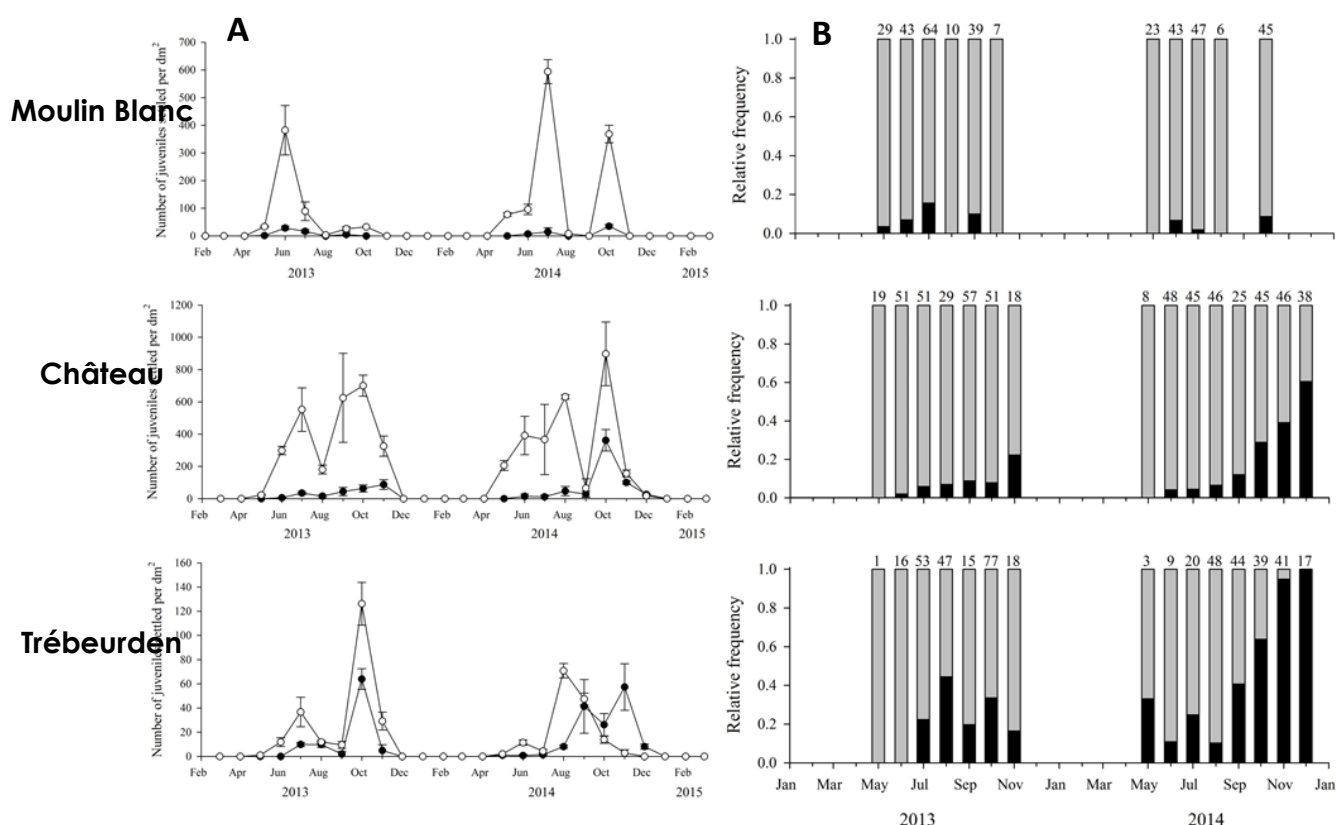


Figure 2.3. (A) **Variation mensuelle** (moyenne \pm erreur standard, $n = 3$) **de la densité des juvéniles exprimée en nombre de juvéniles par dm^2 de *C. robusta* (points noirs) et de *C. intestinalis* (points blancs)** et (B) **abondance relative mensuelle des juvéniles de *C. robusta* (en noir) et *C. intestinalis* (en gris)**, dans les trois ports où les deux espèces sont présentes en syntopie. Il faut noter que les trois graphiques présentés en (A) ont une échelle des ordonnées différente.

A l'exception du port de Trébeurden en 2014, aucun décalage du moment de la sédentarisation des juvéniles n'a été observé entre les deux espèces. Ce résultat indique que les deux espèces présentent un cycle de vie identique dans les localités étudiées et il suggère qu'elles répondent de façon similaire aux conditions et variations environnementales locales. Cette absence de décalage phénologique suggère également que des processus de compétition entre les deux espèces peuvent exister à des stades précoces, notamment en termes de colonisation et monopolisation de l'espace. Les données d'abondance obtenues pour les deux espèces montrent une dominance de l'espèce indigène quel que soient les mois ou les ports étudiés (Figure 2.3.A), un résultat identique à celui observé au stade adulte (chap.1 & chap.3). Les valeurs de densité mensuelle peuvent atteindre jusqu'à 900 juvéniles par dm^2 pour *C. intestinalis*

(i.e. au port du Château en octobre 2014, Figure 2.3.A). Au contraire, la valeur maximale observée pour *C. robusta* est de 350 juvéniles par dm² dans le même port et à la même date (Figure 2.3.A). La comparaison de l'abondance relative des deux espèces au cours des deux années montre toutefois une augmentation significative de l'abondance relative de *C. robusta* dans deux des trois localités syntopiques (Château et Trébeurden ; Figure 2.3.B), en période automnale ; cette variation s'accroît en 2014 par rapport à 2013. Ce résultats suggère que même si l'espèce non-indigène est présente en plus faible abondance par rapport à sa congénère indigène, les températures plus élevées au cours des périodes estivales et automnales lui sont favorables pour coloniser le substrat. Les variations observées entre ports, saison et années suggèrent par ailleurs que *C. robusta* a encore une dynamique instable dans certaines localités comme celle du Moulin Blanc. Un suivi à long terme des populations des deux espèces aux stades juvéniles et adulte pourrait nous permettre d'évaluer la durabilité de la coexistence des deux espèces, voire l'évolution de l'invasion par l'espèce non-indigène, notamment compte-tenu de l'augmentation en cours et attendue dans les prochaines décennies des températures en Manche occidentale (Gallon *et al.* 2014).

Cette étude a été réalisée en collaboration avec Laurent Lévêque de la Fédération de Recherche FR2424 de la Station Biologique de Roscoff. Aurélien Courteille a contribué à l'acquisition de certaines des données moléculaires pour les échantillons de 2013 dans le cadre d'un stage de Master 2 de l'Institut Universitaire Européen de la Mer (Janvier à Juin 2014).

II. Article 1

Similar recruitment timing with differential success between one alien tunicate and its native congener – competitive interactions in early stages

Sarah Bouchemousse^{1, 2*}, Laurent Lévêque^{1, 3} and Frédérique Viard^{1, 2*}

¹ Sorbonne Universités, UPMC Univ Paris 6, UMR 7144, Station Biologique de Roscoff, Place Georges Teissier, 29680 Roscoff, France

² CNRS, UMR 7144, Equipe Div&Co, Station Biologique de Roscoff, Place Georges Teissier, 29680 Roscoff, France

³ CNRS, FR 2424, Station Biologique de Roscoff, Place Georges Teissier, 29680 Roscoff, France

*Current address : UMR7144, Equipe Diversité et Connectivité dans le paysage marin Côtier (Div&Co), CNRS-UPMC, Station Biologique de Roscoff, 29680 Roscoff, France

Email: sarah.bouchemousse@sb-roscoff.fr; viard@sb-roscoff.fr

En préparation pour le journal *Biological Invasions*

Abstract

Most marine invertebrates are characterized by a complex benthic-pelagic life cycle. Early-stages, i.e. larvae and juveniles, are known to determine the adult population distribution and abundances. They are thus key stages to examine when biologically similar native and non-native species live in syntopy, as they may strongly influence the competitive interactions between the two congeneric species. We examined settlement dynamics and success of two important members of the fouling community established on human-made infrastructures at a worldwide level: *Ciona intestinalis* and *C. robusta* (formerly known as *C. intestinalis* type B and *C. intestinalis* type A). In the English Channel, the two species live in syntopy because of the recent introduction of *C. robusta* in the European native range of *C. intestinalis*. Using experimental settlement panels replaced monthly over two years in four marinas and species-specific molecular markers, we documented similar settlement dynamics for the two species, with two main settlement periods in the Western English Channel. This result suggests that the two species respond similarly to seasonal environmental variations. However we showed that 1) the recruitment success of the non-native is poor as compared to the native congener and 2), with one exception, there is no strong phenological shift between the two congeners. These results suggest that the native species tends to monopolize space even at the early life history stages. In addition, these results raise questions about the factors controlling for larval supply and juvenile fitness of the non-native species and, over a longer time perspective, the likelihood of the establishment of the non-native species in the study area.

Keywords: competitive interaction, early stages, *Ciona* spp., congeneric species, biological introduction, long term coexistence

Introduction

The increasing extent of human-made infrastructures like harbors, marinas or aquaculture facilities is modifying marine coastal landscapes at an unprecedented rate on a global scale (Airoidi, Beck 2007; Bulleri, Chapman 2010). Being in contact with introduction vectors of non-native species (NNS), these human-made infrastructures are gateways and bridge-heads for biological invasions in marine ecosystems (Briggs 2012; Airoidi et al. 2015). Numerous non-native species are established in these artificial habitats (Tyrrell, Byers 2007; Ruiz et al. 2009; Briggs 2012). For example, Arenas et al. (2006) showed that they may represent up to 25% of the species of the sessile fauna established in marinas, in southern England.

Biological introductions disrupt the natural (spatial) barriers that prevent competitive interactions between closely related taxa, like congeneric species. Such human-driven secondary contacts between congeners have been described in several important members of the fouling community established in human-made infrastructures, as exemplified, in tunicates with the co-existence of the NNS *Botrylloides violaceus* with its native congener *B. diegensis* along the Western Coast of North America (references in Bock et al. (2011)). When congeners display similar biological traits and ecological niches, competitive processes are expected to be intensified (Branch 1984; Franke et al. 2007). Competitive interactions can rapidly modify the range of distribution of both the native and the non-native species in the newly colonized environment (Levine et al. (2004) for a review in terrestrial ecosystems). Strong competitive interactions between congeners, leading to species exclusion, have also been shown in marine systems, for example, in the *Mytilus* species complex for which a range shift of the native bivalve species *M. trossulus* has been documented, as a consequence of the introduction of *M. galloprovincialis* in California (Lockwood, Somero 2011).

Many of marine NNS are invertebrates (Molnar et al. 2008) that display a benthopelagic life-cycle characterized by a dispersing pelagic larval stage alternating with an adult sessile stage. The importance of the larval stage on population dynamics and the distribution of adult populations of marine invertebrates has long been studied and documented (e.g. Gaines, Roughgarden 1985; Roughgarden et al. 1988; Pechenik et al. 2002; Edwards, Stachowicz 2011, 2012). These early stages are also critical for invasion success or failure (Rius et al. 2014). In particular, larval supply may limit the local proliferation of the invader (e.g. the slipper limpet *Crepidula fornicata*; Rigal et al. 2010), the timing of settlement may facilitate a shift to dominance by non-native species at a community scale (Stachowicz et al. 2002) and the presence of juveniles can prevent settlement or increase post settlement mortality in closely related species (e.g. between native and non-native tunicates; Rius et al. 2009). These processes might be particularly important in determining the biotic interactions of biologically similar congeners living in syntopy.

Here we addressed this issue by comparing the settlement success and dynamics of two emblematic tunicate species, the tunicates *C. robusta* and *C. intestinalis*, previously named *C. intestinalis* type A and *C. intestinalis* type B following their recognition thanks to molecular studies (Suzuki et al. 2005; Nydam, Harrison 2007; Zhan et al. 2010). The two species are well-established in artificial habitats including marinas and harbours and are important members of fouling communities (Lambert, Lambert 1998; Aldred, Clare 2014; Tracy, Reyns 2014). They are living in syntopy in several localities of the western English Channel and the South of Brittany in the Northeast Atlantic (Nydam, Harrison 2011; Bouchemousse et al. 2015). This is the only confirmed region in the world up to now where the two species have been reported living together (Caputi et al. 2007; Zhan et al. 2010). Their coexistence in this region is due to the recent introduction of *C. robusta* in the native European range of *C. intestinalis* (ca. 15–20 years ago; Nydam, Harrison 2011; J.D.D. Bishop, personal communication).

In syntopic localities, only few F1-hybrids have been observed and there is no convincing evidence of contemporary introgressions between the two species (Nydam, Harrison 2011;

Bouchemousse et al. 2015) suggesting that they are reproductively isolated in the wild (although they are partially interfertile in laboratory conditions; Suzuki et al. 2005; Bouchemousse et al. 2015). Competitive interactions rather than evolutionary interactions (e.g. introgressive hybridization) are more likely to determine the fate of these two congeneric species living in syntopy. However, due to their recent taxonomic revision (Brunetti et al. 2015), their respective life cycles, environmental preferences and population dynamics have to be examined in detail.

In a previous study, we documented substantial seasonal variations in the relative abundance of the NNS *C. robusta* as compared to its congener, in localities of the English Channel. In particular, we showed a very low relative abundance of *C. robusta* in spring as compared to the autumn (Bouchemousse et al. 2015). One hypothesis put forward to explain these results was a differential settlement success according to temperature conditions, favouring *C. robusta* during warmer seasons and the native species *C. intestinalis* during colder seasons. However, data was lacking to document the life-cycle and settlement dynamics of *Ciona* spp. in the study region, as well as for the two study species separately.

Ciona species usually display a short life cycle, including the two study species in other regions (i.e. at least one or two generations per year for *C. intestinalis* in Sweden (Dybern 1965), and at least two generations per year for *C. robusta* in the Mediterranean Sea (Caputi et al. 2015)). We thus hypothesized that at least one to two settlement events per year should also occur in the English Channel. Considering putative environmental preferences and the observed variation in adult abundances of the two species (see discussion and references in Bouchemousse et al. 2015), we also hypothesized that the timing and intensity of the settlement should differ between the two species over a year. If such a phenological difference is occurring in the field, this should ultimately lead to a decrease in competition between the two species and help in re-enforcing the reproductive barriers between them. To test for the two hypotheses listed above, using experimental settlement panels, we gathered data on the monthly settlement dynamics of the two *Ciona* species in three localities over two years, and over four years in a fourth one. Species-diagnostic molecular markers were used to reliably identify species at the juvenile stage.

Material & Methods

Experimental design and *Ciona* sp. counting

The settlement dynamics of *Ciona* sp. were investigated in four marinas located along the northern coasts of Brittany and the Bay of Brest (Fig. 1a). The four marinas are representative of various proportions, at the adult stage, of *C. robusta* relative to *C. intestinalis*: Boscon (Roscoff) and Château marinas are characterized by low to moderate proportions of *C. robusta* and Trébeurden and Moulin Blanc marinas are characterized by moderate to high proportion of *C. robusta* (Bouchemousse et al. 2015; Table S1a for details). In each marina, three panels (Fig. 1b), separated by 2 meters from each other, were placed at 1.5 meter depth under a pontoon, close to the local *Ciona* sp. adult population. Each panel has a horizontal side (15 x 15cm, Fig. 1b) to provide a substrate orientated like pontoons. They were deployed without preconditioning, i.e. not soaked in sea water, to allow natural biofilm to develop. They were replaced at the same place every month: therefore juveniles settled were at most 4 weeks old. During their transport to the laboratory, they were secured in a cooler filled with seawater taken from the marina.

In all marinas, except Moulin Blanc, panels were retrieved and brought back to the laboratory for treatment each month between March 2013 and March 2015 (i.e. 25 monthly datasets). In Moulin Blanc, the same experimental design was started much earlier, with the first panel series set-up in November 2010 (and thus retrieved in December 2010) and the last one retrieved in March 2015; in this locality, the settlement dynamics were thus investigated over 52 months labeled from 0 (December 2010) to 51 (March 2015). In the laboratory, for each panel, the number of juveniles was recorded under a binocular microscope using a grid composed of 11x11

cells of 1.21 cm² for each (1.1x1.1 cm, Fig. 1c). To avoid edge effects, the first row of cells along the edges was not considered in the counting. Treatment of panels was done the day or the day-after their collection in the field

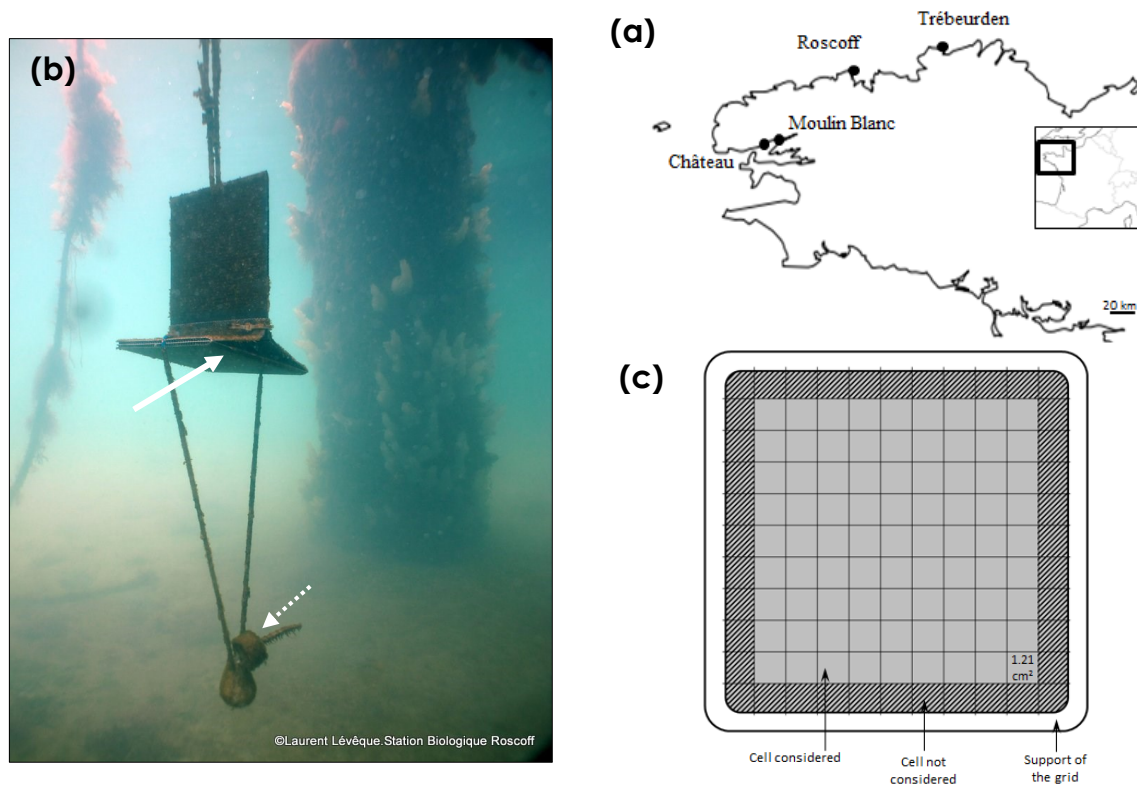


Figure 1. (a) Map of the study sites. (b) Experimental panels used. Juveniles of *Ciona* sp. were counted and sampled on the horizontal panel (indicated by a plain arrow). The dotted arrow points out a temperature data logger (TidbiT@v2). Photo credit: Laurent Lévêque (c) Counting was done using a grid of 11x11 cells. Hatched cells along the border of the panel were not considered to avoid edge effects.

Sampling and molecular species identification of the juveniles

Because of their small size, the juveniles of *C. robusta* and *C. intestinalis* could not be reliably discriminated morphologically during the counting. A species-diagnostic marker was thus used on a sample of juveniles collected on the panels in 2013 and 2014 to estimate the proportion of the two species on the panels. When *Ciona* sp. was abundant enough, up to 30 juveniles were sampled on each panel and preserved in 100% ethanol. To optimize DNA extraction success, the largest juvenile was sampled in one cell, repeating the sampling in each consecutive cell until reaching a maximum number of 30 cells (see Table S2 for sampling size per panel). DNA extraction was performed with Nucleospin® 96 Tissue Kit according to the manufacturer's protocol (Macherey-Nagel, Germany) with an additional treatment for removing RNA (10µl of a stock solution of 100mg/ml of RNase was added for 20 min after the tissue lysis step).

For juveniles sampled in 2013, we used the degenerate primers developed by (Nydam, Harrison 2007) shown to be reliable on adults sampled in the study populations (Bouchemousse et al. 2015). Species identification is based on a PCR-RFLP protocol (i.e. enzymatic digestion of the PCR product) detailed in (Nydam, Harrison 2011). Because amplification success was low for juveniles sampled in 2014, we developed species-specific primers which increase the genotyping success significantly. These species-specific primers only amplified mtDNA of one of the two species. The PCR fragment includes the region with the restriction site targeted with the degenerated non-specific primers previously used. Thus both PCR-RFLP and direct PCR essays can

be carried out with these primers. The forward and reverse primer sequences for amplifying *C. robusta* are respectively, CiA-mtCOLshort-F: 5'- ACAGTTATCCTCCTTATCTGCA -3' and CiA-mtCOLshort-R: 5'- TGGATCTCTCTCCCATTCCG -3'. The forward and reverse primer sequences specific to *C. intestinalis* are, respectively CiB-mtCOLshort-F: 5'- CTTGCATTAGCTGGGGTTTC -3', CiB-mtCOLshort-R: 5'- AGGATCCCTTCTCTGTAGGA -3'. The amplifications with these primers were carried out in a total reaction volume of 20 µl, with 5µl of template DNA diluted to 1:10, 1X Buffer (Thermoprime, ABGene®), 0.18 mM of each dNTP, 1.8 mM of MgCl₂, 0.05 µg/µl of bovine serum albumin, 0.05 µM of each primer and 0.18 U of Taq Polymerase (Thermoprime, ABGene®).

A touchdown PCR program was used, starting with 5 min at 95°C followed by 5 cycles with 30s at 95°C, 30s at an initial temperature of 56°C (then decreasing by 1°C per cycle), 30s at 72°C and then 30 cycles at 95°C for 30s, 52°C for 30s, 72°C for 30s and a final elongation step at 72°C during 10 min. As for degenerated primers, the species diagnostic was easily revealed on an agarose gel (2%) as CiA-mtCOLshort primers amplify a fragment of 306 base pairs (bp) in *C. robusta* and CiB-mtCOLshort primers amplify a fragment of 239 bp in *C. intestinalis*. Both the non-amplification and the PCR product size can be used to make the species identification. Note that every individual was amplified using the two PCR primer pairs to check for consistency of the results.

Statistical analyses

We measured the number of juveniles settled per dm² (i.e. juvenile density) to take into account that in a few cases (4.6% of the panels) some cells were damaged, reducing the overall surface area to examine. We first investigated the annual settlement dynamics of *Ciona* sp. per marina for each year separately. Assuming that each major settlement event follows a Gaussian distribution, the number and characteristics (e.g. average time of settlement) of the different settlement periods (i.e. discrete cohorts of settlers) were estimated using a modal decomposition analysis carried out with the R package MIXDIST (R Development Core Team 2010). This package contains maximum likelihood-based methods to find the best fit between the observed data and a mixture of Gaussian distributions (Macdonald, Green 1988). The density data were smoothed using a weighted moving average at the 3rd order to rule out irregularities (Frontier, Pichod-Viale 1991).

Prior to the modal decomposition analysis, the normality of each observed dataset was tested using the *shapiro.test* function in R. Significant deviations from normality is indeed a pre-requisite before attempting to find the best mixture of Gaussian curves explaining the data. To compare the intensity of settlement among sites and settlement peaks, we used a non-parametric two ways analysis of variance (i.e. rank test of Scheirer-Ray-Hare; Sokal, Rohlf 1995) on maximum density values (i.e. density value for the month showing the highest density of juveniles) using panels as replicates. For factors with a significant effect, pairwise comparisons were carried out with pairwise Wilcoxon rank sum tests.

Except in Roscoff, where only *C. intestinalis* was found, the same analyses were done for each species separately. The density of each of the two study species was computed for each panel and each month by multiplying the density value of *Ciona* sp. by the relative proportion of *C. robusta* (or *C. intestinalis*) obtained following DNA-based species identification. In addition, the seasonal changes of the relative abundance of *C. robusta* were investigated using a linear regression analysis between the proportion of *C. robusta* and time (months), for each site and year.

Results

Settlement analyses of *Ciona* sp. reveal two settlement periods within a year

The settlement surveys carried out over 52 months in the marina of Moulin Blanc, and over 25 months in the three remaining marinas, showed important changes in the number of juveniles observed monthly over the study period (Figure 2; details in Table S2 and Table S3). In all marinas, juveniles were mostly observed between May-June until November-December. Almost no settlers were observed from January to March. In addition, whatever the year or the marina, the distribution of the density of *Ciona* sp. juveniles differed significantly from a normal distribution (Figure S1). Modal decomposition analyses clearly identified for each study year two Gaussian curves corresponding to two major periods of settlement with a short overlap. The average time of each settlement period (i.e. determined by the mode of the Gaussian curve) is provided in Table 1. Observed distribution and Gaussian curves are shown in Figure S1, with parameters characterizing the Gaussian curves detailed in Table S3. Over a year, the first settlement period corresponds to juveniles settled mainly between April and August (spring-summer) and the second settlement period corresponds to juveniles settled mainly between August and December (late summer-autumn; Figure 2).

Table 1. Mean settlement time for each settlement period identified over the course of the study (i.e. 52 months), for *Ciona* spp. and for *C. robusta* and *C. intestinalis* separately. The unit for the settlement time is in month, from 0 (December 2010) to 51 (March 2015). They were identified with modal decomposition analyses carried out separately for each year on the monthly distribution of the mean density per panel ($n = 3$) of juveniles. The settlement time indicated is the modal value of each Gaussian curve identified. Details of the results of the modal decomposition analyses are given in Figure S1 and Table S4 for *Ciona* sp. and in Figure S2 and Table S5 for the two species separately. Note that no *C. robusta* was ever identified in the Roscoff marina. The same label for the settlement period was used across sites for sake of comparison among sites. Settlement periods 1-2, 3-4, 5-6 and 7-8 were observed in 2011, 2012, 2013 and 2014 respectively.

Site	Settlement period label	Mean settlement time (in months)		
		<i>Ciona</i> spp.	<i>C. robusta</i>	<i>C. intestinalis</i>
Moulin Blanc	1	5.81		
	2	10.13		
	3	16.76		
	4	20.40		
	5	29.64	29.80	29.62
	6	33.08	32.26	33.12
	7	42.28	42.20	42.3
	8	45.63	45.50	45.6
Château	5	30.37	30.96	30.34
	6	33.30	33.70	33.26
	7	42.41	42.41	42.5
	8	45.53	45.64	45.6
Roscoff	5	29.83	Irr.	29.83
	6	32.38	Irr.	32.38
	7	42.76	Irr.	42.76
	8	44.99	Irr.	44.99
Trébeurden	5	30.64	30.82	30.42
	6	33.59	33.47	33.59
	7	42.84	43.93	41.33
	8	44.39	46.24	44.13

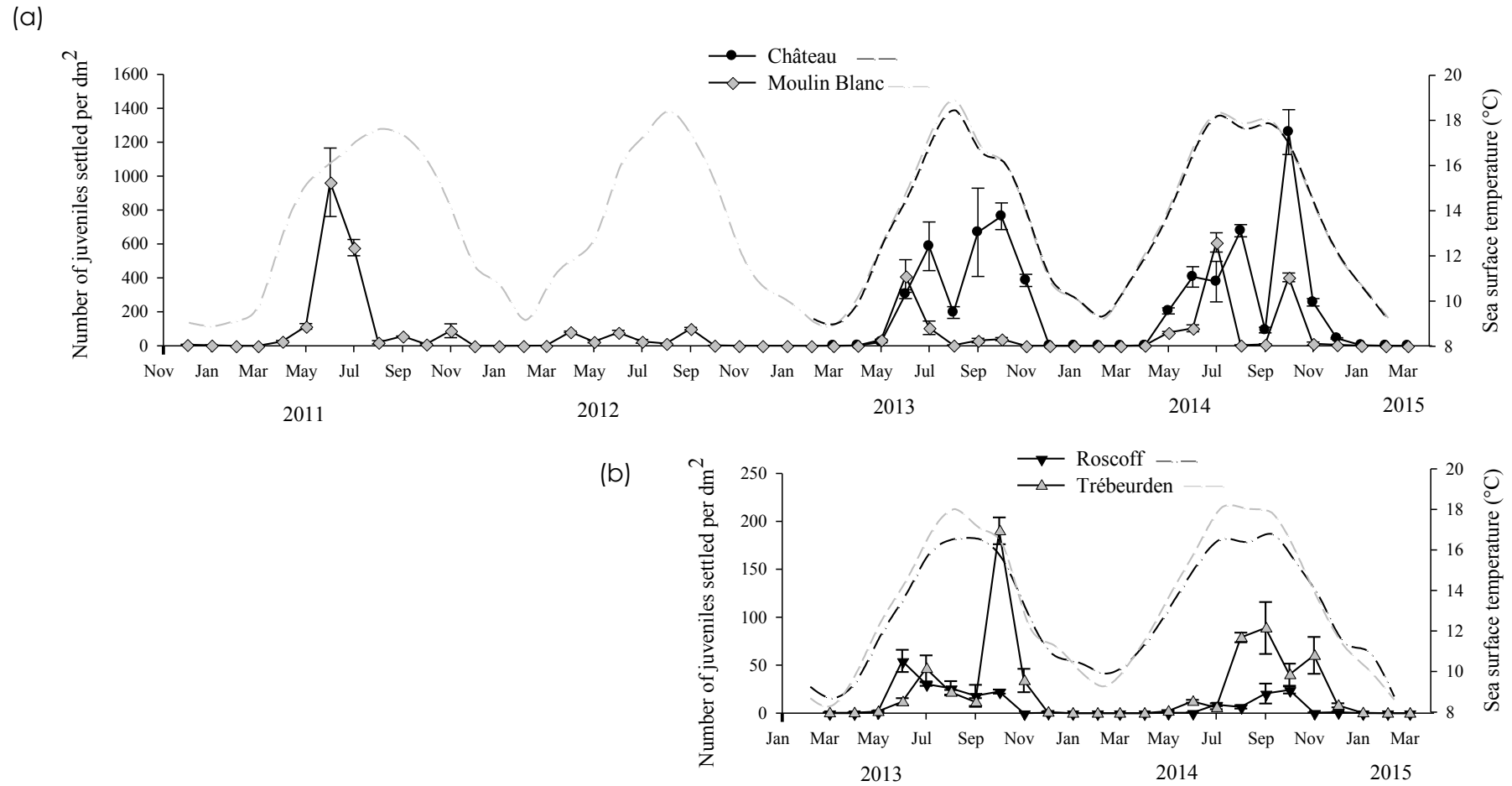


Figure 2. **Monthly variation** (mean \pm standard error, $n = 3$) **of the number of juveniles of *Ciona* spp. recorded per dm² on panel (solid line) and of the daily average sea surface temperature (dotted line) recorded using a temperature data logger (Tidbit@v2) in the four study marinas (a) in the Bay of Brest (Château and Moulin Blanc marinas) and (b) along the northern coast of Brittany (Roscoff and Trébeurden marinas).** Note that there is a different scale for the Y-axis between the two graphs.

Variations among sites of the settlement patterns of *Ciona* spp.

Density data displayed in Figure 2 first show that settlement intensity is variable among sites, with much higher values in the marinas of Château and Moulin Blanc as compared to the marinas of Roscoff and Trebeurden. For instance, in Chateau, the highest mean density values observed during the 4 settlement periods observed during the survey were 586.5 (\pm 248.5 SD), 763.2 (\pm 136.1 SD), 677.8 (\pm 62.3 SD), 1259.4 (\pm 229.2 SD) individuals settled per dm² in July 2013, October 2013, August 2014 and October 2014, respectively (Table S3). By comparison, in Roscoff, the density values were always below 54.4 (\pm 20.1 SD) individuals settled per dm², the mean density value for June 2013.

Over 2013-2014, the maximum density values were not significantly different between settlement periods (Table 2a) but there was a significant difference between sites, as shown by the two-way non-parametric analysis of variance (Table 2). Pairwise comparisons pointed out that most of the differences were explained by higher values in the marina of Château compared to other marinas (Table 2a). Although the variations among settlement periods for a given site seem to be moderate, most extreme events were however detected over longer time-series: in Moulin Blanc, a significant effect of the settlement periods was observed on the maximum density values (Kruskal-Wallis test: $H = 20.23$, $df = 7$, $P = 0.005$); this was mainly explained by a very high settlement rate observed in spring 2011 (i.e. June 2011, 963.8 ± 349.5 , mean \pm SD) as compared to the very low rates for the next three settlement periods, with respective mean density values of 88.4 (\pm 136.1 SD, November 2011), 82.0 (\pm 7.8 SD, April 2012) and 101.0 (\pm 13.0 SD, September 2012) (Figure 2; Table S2).

Table 2. **Result of the non-parametric analysis of variance** (i.e. rank test of Scheirer-Ray-Hare) testing the effect of the settlement period ($n = 4$, identified with modal decomposition analyses; see Main text) and marina ($n=4$ or 3) on the maximum density (density value at the settlement peak of each settlement period) of a) *Ciona* spp. , b) *C. robusta*, and (c) *C. intestinalis*. Degree of freedom (df), sum of squares (SS), value of the statistic (H) and probability-value are given (P-value). Significant P-values are shown in bold. For significant effects, pairwise comparisons are provided (i.e. pairwise Wilcoxon rank sum tests). MBI: Moulin Blanc, Cha: Château, Ros: Roscoff, Treb: Trébeurden. 5, 6, 7, 8 are the labels used in Table 1 for defining the settlement periods

(a) Density of <i>Ciona</i> spp.					(c) Density of <i>C. robusta</i>				
Source of variance	df	SS	H	P-value	Source of variance	df	SS	H	P-value
Settlement period	3	1067.04	7.41	0.059	Settlement period	3	901.72	8.12	0.044
Marina	3	5941.70	40.42	<0.001	Marina	2	1000.67	13.52	0.001
Interaction	9	2164.50	4.908	0.842	Interaction	6	863.94	3.89	0.691
Residuals	32	116.33			Residuals	24	1117.67		

Pairwise				Pairwise			
	Cha	MBI	Ros		Cha	MBI	
MBI	0.024			MBI	0.015		
Ros	<0.001	0.007		Treb	0.030	0.119	
Treb	<0.001	0.205	0.687				

(c) Density of <i>C. intestinalis</i>				
Source of variance	df	SS	H	P-value
Settlement period	3	308.3	2.09	0.552
Marina	3	6489.9	44.15	0.001
Interaction	9	1926	4.37	0.886
Residuals	32	486.3		

Pairwise			
	Cha	MBI	Ros
MBI	0.002		
Ros	<0.001	0.002	
Treb	<0.001	0.007	0.119

Pairwise			
	5	6	7
6	1.000		
7	1.000	1.000	
8	0.005	0.219	0.023

Comparison of settlement patterns between *C. robusta* and *C. intestinalis*

A total of 1650 juveniles were successfully genotyped in 2013 and 2014 with ca. 17% of them identified as *C. robusta* according to the mtCOI diagnostic marker. Details of the number of juveniles successfully genotyped and the relative abundance of *C. robusta* per month and per marina are available in Table S3. Throughout the survey, juveniles of *C. robusta* were recorded in three of the four marinas surveyed, namely Trebeurden, Chateau and Moulin Blanc but surprisingly absent in Roscoff ($n = 272$ juveniles genotyped) where adults had been reported in 2012 before starting our panel experiment (Bouchemousse et al. 2015). Figure 3 displays the juvenile density of the two species in the marinas where they are in syntopy.

Modal decomposition analyses carried out for each species separately showed the same results as those for all *Ciona* spp. analyzed together. Two settlement periods were observed in 2013 and 2014, for both study species, and most of the variations observed in density values at settlement peak were explained by a site effect (Table 2b and 2c). The average settlement time per settlement period and marina is provided in Table 1 for *C. intestinalis* and *C. robusta*. Details about the modal decomposition outcomes (graphs and parameters) are detailed in Figure S1 and Table S4. Interestingly, the settlement timing of the two species was very similar whatever the settlement period (Table 1, Figure 4). There is however one exception in Trébeurden in 2014: *C. robusta* settlement was delayed by at least two months, with mode values (Table 1) of the seventh and eighth settlement periods being 43.93 and 46.24 respectively, for *C. robusta*, but 41.33 and 44.1 respectively, for *C. intestinalis*.

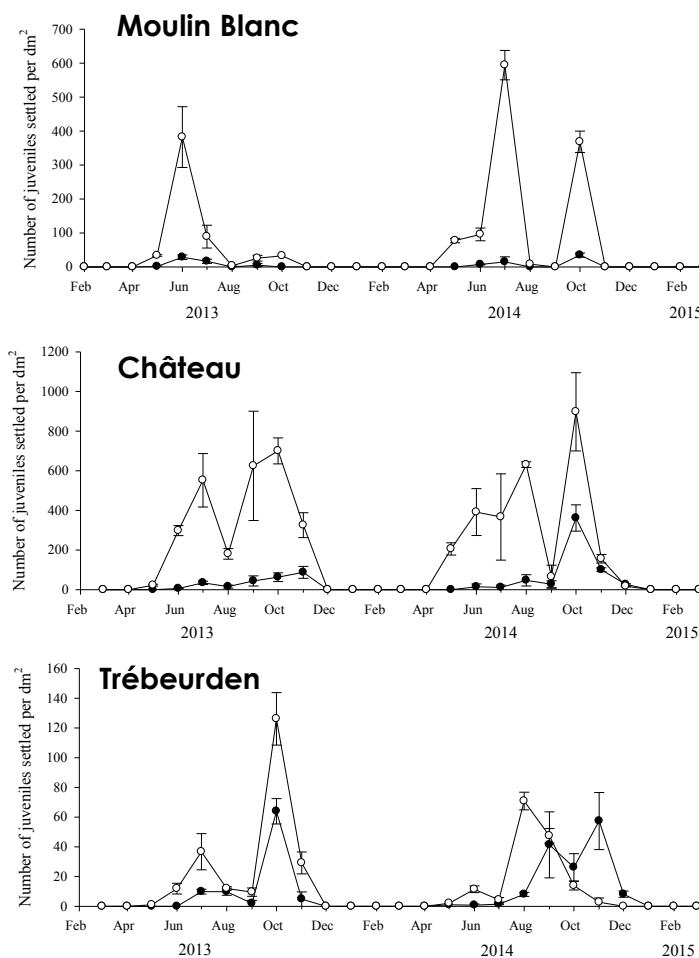


Figure 3. **Monthly variation** (mean \pm standard error, $n = 3$) of the density of juveniles of *Ciona robusta* (black circles) and *C. intestinalis* (white circles) in the three marinas where the two species were found living in syntopy. The three graphs are displayed with different scales for the Y-axis.

When comparing the two congeners, another interesting finding was the difference in settlement intensity between the two species (Figure 3). For example, in 2013 in the marina of Château, the average density value per panel, during the period with settlers, ranged from 6.0 (\pm 0.9 SD) in June to 62.9 (\pm 37.8 SD) in October for *C. robusta*, but from 22.4 (\pm 8.4 SD) in May to 700.3 (\pm 113.6 SD) in October (Table S3) for *C. intestinalis*. In this marina, the mean density value encompassing months in which juveniles were recorded (i.e. May to November 2013) was 31.5 (\pm 36.5 SD) for *C. robusta* and 386.5 (\pm 293.2 SD) for *C. intestinalis*. There was a significant departure of the relative proportion of the two species from a balanced proportion of 0.5:0.5 (using a binomial test in R) for 34 out of 39 months during which settlers were observed, always with a large excess of *C. intestinalis* juveniles (Table S3). Although the relative density of *C. robusta* compared to *C. intestinalis* is low, we observed a significant increase of the relative proportion of *C. robusta* over the study period in two of the three marinas surveyed, i.e. Château and Trébeurden (Figure 5). In the marina of Trébeurden, the relative proportion of the two species did not deviate from a balanced proportion of 0.5:0.5 in October and November 2014 (Table S3).

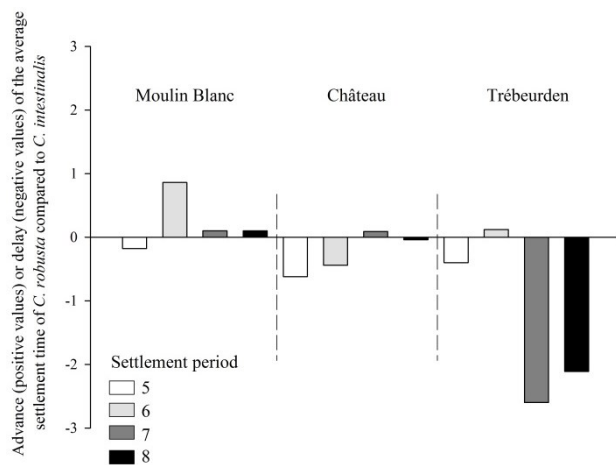


Figure 4. Differences in the timing of settlement between the two study species. The time difference (unit in months) between the average settlement times of *C. robusta* as compared to *C. intestinalis* is indicated per marina and for each settlement period labeled 5-6 and 7-8 for settlement period observed in 2013 and 2014 respectively (See Table 1).

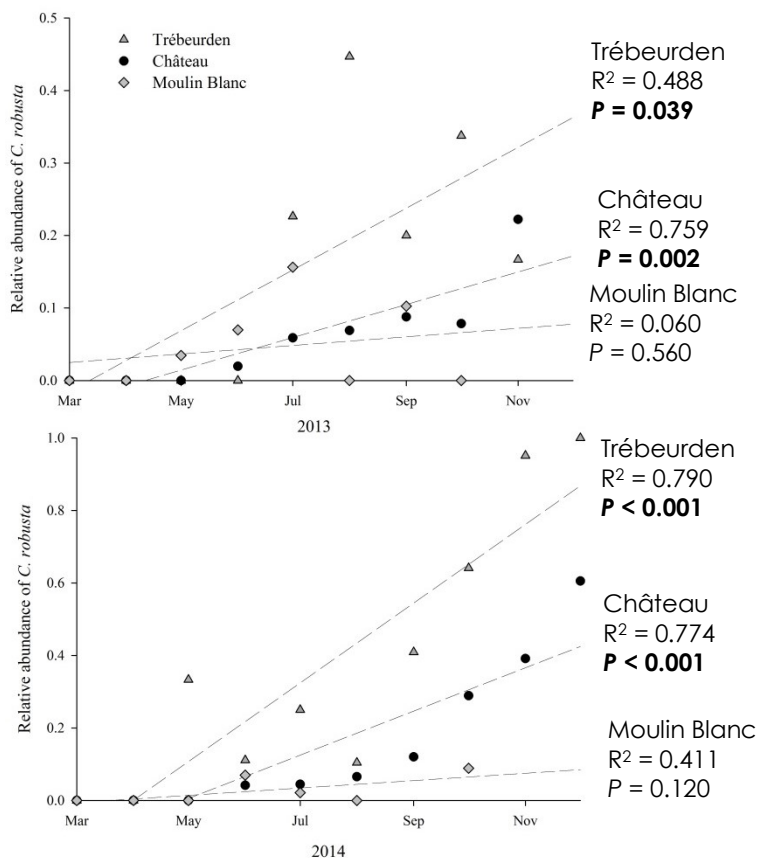


Figure 5. Monthly value of the percentage of *C. robusta* (i.e. relative abundance compared to *C. intestinalis*) for the two study years (top graph: 2013; bottom graph: 2014) in the three marinas where the two species were found living in syntopy (i.e. Trébeurden, Moulin Blanc and Château). Results of the linear regression (R^2 and P -value) are given for each site and each year. Significant linear regressions are indicated in bold (P -value < 0.05). The two graphs are displayed with a different scale for the Y-axis.

Discussion

No difference in phenology between the non-native and the native congeners in syntopic localities

In all marinas, except Roscoff, both *C. intestinalis* and *C. robusta* were found on the experimental panels. When the two species were present for a given location and month, the juveniles of the two species were found on each panel without any evidence of spatial clustering, indicating a very close syntopy between the two species. That the two species are well mixed on experimental substrates is in agreement with observations made for adults growing under pontoons (e.g. within 20 x 25 cm quadrats; Table S1b). Based on modal decomposition analyses, in the three marinas where juveniles of the two species settled, we identified two settlement periods for each species independently, for each year examined: one settlement period was observed at the end of spring and early summer and a second one during fall. This result is in agreement with observations of simultaneous gamete production by the adults during spring and autumn for the two species in syntopic localities of the English Channel (Bouchemousse et al. 2015).

This study, the first documenting the settlement dynamics of the two species in a situation of syntopy can be compared with previous studies that reported settlement dynamics for one or the other of the two species independently. In these studies, the previously accepted name "*C. intestinalis*" or the terms "*C. intestinalis* type B" and "*C. intestinalis* type A" following their discovery (Nydam, Harrison 2007) were used, but based on the geographical location of the study, we could determine the identity of the species examined. For *C. intestinalis*, our findings are in agreement with results obtained in Nova Scotia and Prince Edward Island (Carver et al. 2003; Howes et al. 2007; Vercaemer et al. 2011), in Sweden (Dybern 1965) and in Danish Fjord (Petersen, Svane 1995), where two settlement periods were identified. In the English Channel, the only data available for adults only (in Plymouth (Orton 1914, 1920) and Brest-Moulin Blanc (France) L. Leveque, unpublished data) also fit with the assumption of two generations per year.

For *C. robusta*, our study is the first to document settlement patterns of this species in the NE Atlantic but data exist in San Francisco Bay, another region where the species has been introduced: two settlement periods were also observed (one occurring in August and one in October-November (Blum et al. 2007)). The other data documenting the life-cycle of *C. robusta* are based on temporal surveys of adults in the Mediterranean Sea: Caputi et al. (2015) suggested the existence of more than two generations with reproductive adults present throughout the year including during winter months. This later result is also in agreement with the review by Dybern (1965) documenting three or four generations of the previous nominal accepted species "*C. intestinalis*" in different regions of the Mediterranean Sea (i.e. Adriatic Sea, eastern and western Mediterranean Sea, references therein).

Our data all point to a similar life-cycle and number of generations per year in the English Channel for the two congeneric species, indicating no major difference in the phenology of the two species. Consequently, competitive interactions for space and food are likely to occur between them even at early stages. Such early competition may strongly influence the adult abundance as recruitment success is a key feature for space monopolization in sessile organisms. There is however one exception to the general pattern observed, in Trébeurden in 2014 (Figure 4), where recruitment of *C. robusta* juveniles was delayed by two months as compared to its native congeners. There is so far no clear explanation to this singularity, especially considering that we did not observe any obvious differences of the gamete production by adults of the two species in this locality (Bouchemousse et al. 2015). This is however an interesting finding deserving further study, as it may be indicative of a start of a phenological change between the two species in this locality, which is also one locality where *C. robusta* can exhibit a higher relative abundance compared to *C. intestinalis* at the adult stage (Bouchemousse et al. 2015).

Can larval supply or environmental conditions explain variations in settlement success?

The overall settlement timing was similar for the two species but we observed differences in settlement intensity at different levels, in particular between sites and between the two settlement periods. In particular, for *C. intestinalis*, a much higher number of settlers was observed in the marinas of the Bay of Brest (i.e. Château and Moulin Blanc) compared to the two marinas located on the northern coast of Brittany (i.e. Roscoff and Trébeurden). This site effect is less pronounced for *C. robusta* although the marina of Château still shows a higher number of settlers compared to the other marinas.

Similar observations were also found at the adult stage: as part of a tunicate community survey (S. Bouchemousse, L. Leveque and F. Viard, unpublished data), adult density data for *C. intestinalis* and *C. robusta* were obtained in spring and in autumn 2014 in several localities including the four examined in the present study (Table S1b). These data showed the same trend as the one observed, in particular a higher density for *C. intestinalis* in the two marinas in the Bay of Brest, and a higher density for *C. robusta* in the Chateau marina, a pattern observed both in spring and autumn. Local hydrodynamic features can have a strong impact on the density and the aggregation of *C. intestinalis* juveniles (Havenhand, Svane 1991), and may explain this locality effect. Both the marinas of Château and Moulin Blanc are located in the bay of Brest, a semi-closed system, which may contribute to retaining larvae close to the sites where they have been released and thus promote larval supply by resident adult populations (Gaines, Bertness 1992).

Conversely, the marina of Roscoff is an open-marina located in the Bay of Morlaix in which tidal currents are strong, which may prevent local larval retention. Significant larval export out of this bay has been demonstrated using an analytical hydrodynamic model for the mollusk *Crepidula fornicata*, another non-native species in the Bay of Morlaix (Rigal et al. 2010). This was suggested as a possible explanation for the low proliferation of this non-native species in the bay. Similar processes may occur for *Ciona* species, although their larval stage is short and their ability to settle fast (within 12-24 hours) following fertilization. Fine-scale hydrodynamic models encompassing study marinas and ports are unfortunately not available. Dedicated models should be developed to examine in further detail the role of larval supply/larval export to/from marine urban environments.

For *C. robusta*, we found a significant effect of the settlement period on settlement intensity (Table 2b), with a higher number of juveniles during the second settlement event (Fig. 3). As pictured in Fig. 5, the relative abundance of *C. robusta* juveniles settled increased over time within a year, in two of the three study marinas where this species was present (i.e. Trébeurden and Chateau). This increase of *C. robusta* relative to *C. intestinalis* during autumn was documented for adults in a previous study (Bouchemousse et al. 2015). It was also documented by adult density data available in the study marinas (Table S1b), with up to a two to three-fold increase in the density of *C. robusta* in autumn as compared to spring. This increase might be due to warmer conditions more favorable to *C. robusta*, considered to be a warm-temperate species as compared to *C. intestinalis* considered as a more cold-temperate species (Procaccini et al. 2011; Bouchemousse et al. 2015).

This difference in terms of temperature preferences may also explain the complete absence of *C. robusta* in the marina of Roscoff. This marina is located in the coldest part of the Brittany coastline (Gallon et al. 2014) and is characterized by maximal temperatures below 17°C (Figure 2.b). These temperature conditions may favor the establishment of *C. intestinalis* at the expense of *C. robusta* (Bouchemousse et al. 2015). For *C. intestinalis*, we did not find a significant effect of the settlement period in 2013 and 2014 (Table 2). However, for *Ciona* sp., we observed important changes in the marina of Moulin Blanc over a longer survey (i.e. 4 years; Figure 2). The settlement rate in 2012 was particularly low compared to other years. This result is probably due to a high mortality rate of the adult population of *Ciona* sp. following the exceptional rainfalls that

occurred in April and May 2012, which may have dramatically reduced the salinity at the sea surface (L. Lévêque, personal observation).

Altogether the site and settlement effects documented here for juveniles are similar to those observed for adults, indicating a positive feedback loop between the density of adults and of juveniles in *Ciona* sp., and for the two species separately. The changes over time (i.e. between seasons) are however more pronounced for *C. robusta*, suggesting that warmer conditions may facilitate the settlement of the non-native species and subsequently increase its chance of recruitment as compared to its native congener. However, despite this advantage during the warmer season, we always documented a low recruitment success of *C. robusta* as compared to *C. intestinalis*, as discussed below.

A poor recruitment success which may limit the invasiveness of *C. robusta*

An interesting finding of our study was a marked difference of the settlement intensity between the two species, with much higher density values recorded for *C. intestinalis* than for *C. robusta* in every locality where the two species coexist (Fig. 3). The maximum value observed over the whole dataset was in the marina Château in October 2014, with an average density value computed over the three panels of 361.6 juveniles per dm², a value more than two times lower than for *C. intestinalis* (898.7 juveniles per dm²) at the same place and date. The same holds true when considering values averaged over the whole survey (over all locations and months for which recruits were observed), with a value of 37.5 juveniles per dm² for *C. robusta* and 183 juveniles per dm² for *C. intestinalis*.

It is important to note that we may have over-estimated the presence of *C. robusta* in our study. This species has a higher juvenile growth rate than *C. intestinalis* under laboratory conditions at 17°C (M. Malfant & F. Viard, unpublished data). When we sampled the juveniles for species identification, we collected the largest juvenile in each sampled cell (30 consecutive cells, see Material and Methods), thus we may have biased our sampling in favor of *C. robusta* because of its faster growth rate. Note that this putative sampling bias was the same for every panel so that it does not change our findings. The relative density values of *C. robusta* as compared to its native congener could however be even lower than the values we computed.

This low settlement density of *C. robusta* could be explained by its introduction and co-existence with *C. intestinalis*. Similar values have however been observed for *C. robusta* in another region, the San Francisco Bay, where it has been introduced but does not co-exist with *C. intestinalis*, with a maximum density of ca. 300 juveniles per dm² (Blum et al. 2007). Our density data for *C. intestinalis* are also similar to those documented for *C. intestinalis* in Nova Scotia (e.g. up to 1450 per dm²; Vercaemer et al. 2011) and in Prince Edwards Island (e.g. up to 4800 individuals per dm²; Ramsay et al. 2009), two localities in which *C. intestinalis* is considered as a non-native species. The two species are broadcast spawners releasing thousands of gametes in the water column (e.g. estimated at 500 eggs released per individual and per day in Nova Scotia (Carver et al. 2003); and ca. 1000 eggs released per individual and per day in Japanese waters (Yamaguchi 1975)). A differential fertility rate between the two species is unlikely to explain the results. We may hypothesize that the larval settlement success is lower in *C. robusta* than for *C. intestinalis*, for instance because of higher intra-specific competition in *C. robusta*. Marshall & Keough (2003) observed strong effects of intraspecific competition on early post-settlement of *C. robusta* with juvenile mortality rates up to 50% one week after their settlement. To test for this hypothesis, experimental approaches are needed to compare the fitness of the two species, particularly during early stages.

In the three syntopic localities surveyed in the English Channel, density differences similar to those observed at the juvenile stages were observed between the two species at the adult stage in 2014 (Table S1b). The number of adults recorded per m² under pontoons ranged, for *C. robusta*, from 0 in the marina of Moulin Blanc to 11 (\pm 25 SD) in Trébeurden and from 30 (\pm 22 SD) to 305 (\pm 164 SD) for *C. intestinalis* in the same marinas, in spring 2014. These adults are likely to correspond

to the parental generation of the juveniles that settled during the first settlement peak observed during this year. In autumn 2014, the density values were much higher than in spring, as discussed in the previous section, but still showed this differences between the two species with much higher *C. intestinalis* individuals than *C. robusta*: values varied between 31 (\pm 39 SD) and 120 (\pm 112 SD) individuals per m² for *C. robusta* and between 556 (\pm 413 SD) and 1338 (\pm 491 SD) individuals per m² for *C. intestinalis*.

The native *Ciona intestinalis* species is thus at a much higher density at both juvenile and adult stages even during warmer seasons putatively more favorable to *C. robusta*. Inhibition of settlement and subsequent growth by the superior competitor can act in synergy with seasonal variation patterns in species abundance, as shown in numerous cases for marine invertebrates (Grosberg 1981; Davis et al. 1991), including in ascidians (Svane, Young 1989; Rius et al. 2009). For example, using *ex situ* experiments, Rius et al. (2009), showed that the presence of *Styela plicata* juveniles, a non-native ascidian in Australia, increased the mortality of juveniles and reduced the growth of the native ascidian *Microscopus squamiger*, probably by competition for food.

Altogether our results, documenting the similarity of settlement dynamics, but with a lower abundance of *C. robusta* as compared to its native congener, suggest that *C. robusta* might not be sustainably established in the English Channel. This is in light of our observations of its disappearance in the Roscoff marina as well as with the dataset by Nydam & Harrison (2011) who could not find *C. robusta* (named *C. intestinalis* type A) in a sampling made in the English Channel in 2009 although they collected this species in a survey made two years before. In light of the unified framework proposed by Blackburn et al. (2011) to categorize the biological invasion processes, *C. robusta* is likely to correspond to a category of species which has established self-sustained populations but not in every location. Biological invasions are dynamic processes in which 'boom and bust' dynamics are often documented, and which require long-term surveys (Strayer et al. 2006). On the one hand, the low abundance and ephemerality of some *C. robusta* populations may suggest that the species is going to disappear. On the other hand, its successful settlement, in some localities (e.g. Trebeurden, Château) may ensure its long-term establishment at a regional scale. Migration from these source populations may indeed promote its establishment at the regional scale. In addition, the documented warming of seawater in the English Channel (Gallon et al. 2014) may also increase its competitive ability in regard to *C. intestinalis*, its native congener. Long-term monitoring of *Ciona* sp. population associated with experimental studies investigating in detail the competitive interactions between the two species are needed to determine the fate of the non-native species *C. robusta* in the English Channel.

Acknowledgment

The authors are very grateful to G. Dubois, the divers of the Marine Operations department (Service Mer & Observation) at the Roscoff Biological Station, and all of the people who accompanied us in the field for providing help on the recovery of monthly panels over the four years. We also thank the marina operators for allowing us to conduct the experiment. This work benefitted from funding of the ANR project HYSEA (no. ANR-12-BSV7-0011) and the Interreg IVa Marinexus project.

References

- Airolidi L, Beck MW (2007) Loss, status and trends for coastal marine habitats of Europe. In: Gibson RN, Atkinson RJA and Gordon JDM (eds) *Oceanography and Marine Biology*, Vol 45. pp. 345-405
- Airolidi L, Turon X, Perkol-Finkel S, et al. (2015) Corridors for aliens but not for natives: effects of marine urban sprawl at a regional scale. *Diversity and Distributions* 21:755-768
- Aldred N, Clare AS (2014) Mini-review: Impact and dynamics of surface fouling by solitary and compound ascidians. *Biofouling* 30:259-270
- Arenas F, Bishop JDD, Carlton JT, et al. (2006) Alien species and other notable records from a rapid assessment survey of marinas on the south coast of England. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* 86:1329-1337
- Blum JC, Chang AL, Liljestrom M, et al. (2007) The non-native solitary ascidian *Ciona intestinalis* (L.) depresses species richness. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 342:5-14
- Bock DG, Zhan A, Lejeune C, et al. (2011) Looking at both sides of the invasion: patterns of colonization in the violet tunicate *Botrylloides violaceus*. *Molecular Ecology* 20:503-516
- Bouchemousse S, Lévêque L, Dubois G, et al. (2015) Co-occurrence and reproductive synchrony do not ensure hybridization between an alien tunicate and its interfertile native congener. *Evolutionary Ecology*:1-19, doi: 10.1007/s10682-015-9788-1 in press
- Branch GM (1984) Competition between marine organisms: Ecological and evolutionary implications. *Oceanography and Marine Biology* 22:429-593
- Briggs JC (2012) Marine species invasions in estuaries and harbors. *Marine Ecology Progress Series* 449:297-302
- Brunetti R, Gissi C, Pennati R, et al. (2015) Morphological evidence that the molecularly determined *Ciona intestinalis* type A and type B are different species: *Ciona robusta* and *Ciona intestinalis*. *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research* 53:186-193
- Bulleri F, Chapman MG (2010) The introduction of coastal infrastructure as a driver of change in marine environments. *Journal of Applied Ecology* 47:26-35
- Caputi L, Andreakis N, Mastroianni F, et al. (2007) Cryptic speciation in a model invertebrate chordate. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104:9364-9369
- Caputi L, Crocetta F, Toscano F, et al. (2015) Long-term demographic and reproductive trends in *Ciona intestinalis* sp. A. *Marine Ecology* 38:118-128
- Carver CE, Chisholm A, Mallet AL (2003) Strategies to mitigate the impact of *Ciona intestinalis* (L.) biofouling on shellfish production. *Journal of Shellfish Research* 22:621-631
- Davis AR, Butler AJ, Vanaltena I (1991) Settlement behavior of ascidian larvae: Preliminary evidence for inhibition by sponge Allelochemicals. *Marine Ecology Progress Series* 72:117-123
- Dybern BI (1965) The life cycle of *Ciona intestinalis* (L.) f. *typica* in relation to the environmental temperature. *Oikos* 16:109-131
- Edwards KF, Stachowicz JJ (2011) Spatially stochastic settlement and the coexistence of benthic marine animals. *Ecology* 92:1094-1103
- Edwards KF, Stachowicz JJ (2012) Temporally varying larval settlement, competition, and coexistence in a sessile invertebrate community. *Marine Ecology Progress Series* 462:93-102
- Franke HD, Gutow L, Janke M (2007) Flexible habitat selection and interactive habitat segregation in the marine congeners *Idotea baltica* and *Idotea emarginata* (Crustacea, Isopoda). *Marine Biology* 150:929-939
- Frontier S, Pichod-Viale D (1991) *Ecosystèmes: structure, fonctionnement, évolution*. Masson, Paris
- Gaines S, Roughgarden J (1985) Larval settlement rate: A leading determinant of structure in an ecological community of the marine intertidal zone. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 82:3707-3711
- Gaines SD, Bertness MD (1992) Dispersal of juveniles and variable recruitment in sessile marine species. *Nature* 360:579-580

- Gallon RK, Robuchon M, Leroy B, et al. (2014) Twenty years of observed and predicted changes in subtidal red seaweed assemblages along a biogeographical transition zone: inferring potential causes from environmental data. *Journal of Biogeography* 41:2293-2306
- Grosberg RK (1981) Competitive ability influences habitat choice in marine invertebrates *Nature* 290:700-702
- Havenhand JN, Svane I (1991) Roles of hydrodynamics and larval behavior in determining spatial aggregation in the tunicate *Ciona intestinalis*. *Marine Ecology Progress Series* 68:271-276
- Howes S, Herbinger CM, Darnell P, et al. (2007) Spatial and temporal patterns of recruitment of the tunicate *Ciona intestinalis* on a mussel farm in Nova Scotia, Canada. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 342:85-92
- Lambert CC, Lambert G (1998) Non-indigenous ascidians in southern California harbors and marinas. *Marine Biology* 130:675-688
- Levine JM, Adler PB, Yelenik SG (2004) A meta-analysis of biotic resistance to exotic plant invasions. *Ecology Letters* 7:975-989
- Lockwood BL, Somero GN (2011) Invasive and native blue mussels (genus *Mytilus*) on the California coast: The role of physiology in a biological invasion. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 400:167-174
- Macdonald PDM, Green PEJ (1988) User's Guide to Program MIX: An Interactive Program for Fitting Mixtures of Distributions. *Ichthus data systems*
- Marshall DJ, Keough MJ (2003) Effects of settler size and density on early post-settlement survival of *Ciona intestinalis* in the field. *Marine Ecology Progress Series* 259:139-144
- Molnar JL, Gamboa RL, Revenga C, et al. (2008) Assessing the global threat of invasive species to marine biodiversity. *Frontiers in Ecology and the Environment* 6:485-492
- Nydam ML, Harrison RG (2007) Genealogical relationships within and among shallow-water *Ciona* species (Asciacea). *Marine Biology* 151:1839-1847
- Nydam ML, Harrison RG (2011) Introgression despite substantial divergence in a broadcast spawning marine invertebrate. *Evolution* 65:429-442
- Orton JH (1914) Preliminary account of a contribution to an evaluation of the sea. *Journal of Marine Biological Association of Plymouth* 10
- Orton JH (1920) Sea-temperature, breeding and distribution in marine animals. *Journal of Marine Biological Association of Plymouth* 12
- Pechenik JA, Li W, Cochrane DE (2002) Timing is everything: the effects of putative dopamine antagonists on metamorphosis vary with larval age and experimental duration in the prosobranch gastropod *Crepidula fornicata*. *Biol Bull* 202:137-47
- Petersen JK, Svane I (1995) Larval dispersal in the ascidian *Ciona intestinalis* (L). Evidence for a closed population. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 186:89-102
- Procaccini G, Affinito O, Toscano F, et al. (2011) A new animal model for merging ecology and evolution. In: Pontarotti (ed) *Evolutionary Biology: concepts, biodiversity, macroevolution and genome evolution*. Springer, Berlin, pp. 91-106
- R Development Core Team (2005) R: a language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical, Vienna, Austria ISBN: 3-900051-07-0 <http://www.R-project.org>
- Rigal F, Viard F, Ayata SD, et al. (2010) Does larval supply explain the low proliferation of the invasive gastropod *Crepidula fornicata* in a tidal estuary? *Biological Invasions* 12:3171-3186
- Rius M, Potter EE, Aguirre JD, et al. (2014) Mechanisms of biotic resistance across complex life cycles. *Journal of Animal Ecology* 83:296-305
- Rius M, Turon X, Marshall DJ (2009) Non-lethal effects of an invasive species in the marine environment: the importance of early life-history stages. *Oecologia* 159:873-882
- Roughgarden J, Gaines S, Possingham HP (1988) Recruitment dynamics in complex life cycles *Science* 241:1460-1466
- Ruiz GM, Freestone A, Fofonoff PW, et al. (2009) Habitat distribution and heterogeneity in marine invasion dynamics: the importance of hard substrate and artificial structure. In: Whal M (ed) *Marine hard bottom communities*. Springer, Berlin, pp. 321-332

- Sokal RR, Rohlf FJ (1995) Biometry: the principles and practice of statistics in biological research. Freeman, W.H., New York
- Stachowicz JJ, Terwin JR, Whitlatch RB, et al. (2002) Linking climate change and biological invasions: Ocean warming facilitates nonindigenous species invasions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99:15497-15500
- Strayer DL, Eviner VT, Jeschke JM, et al. (2006) Understanding the long-term effects of species invasions. *Trends in Ecology & Evolution* 21:645-651
- Suzuki MM, Nishikawa T, Bird A (2005) Genomic approaches reveal unexpected genetic divergence within *Ciona intestinalis*. *Journal of Molecular Evolution* 61:627-635
- Svane I, Young CM (1989) The ecology and behaviour of ascidian larvae. *Oceanography and Marine Biology Annual Review* 27:45-90
- Tracy BM, Reynolds NB (2014) Spatial and temporal patterns of native and invasive ascidian assemblages in a Southern California embayment. *Aquatic Invasions* 9:441-455
- Tyrrell MC, Byers JE (2007) Do artificial substrates favor nonindigenous fouling species over native species? *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 342:54-60
- Vercaemer B, Sephton D, Nicolas JM, et al. (2011) *Ciona intestinalis* environmental control points: field and laboratory investigations. *Aquatic Invasions* 6:477-490
- Yamaguchi M (1975) Growth and reproductive cycles of marine fouling ascidians *Ciona intestinalis*, *Styela plicata*, *Botrylloides violaceus* and *Leptoclinum mitsukurii* at Aburatsubo Moroiso inlet (Central Japan). *Marine Biology* 29:253-259
- Zhan A, Macisaac HJ, Cristescu ME (2010) Invasion genetics of the *Ciona intestinalis* species complex: from regional endemism to global homogeneity. *Molecular Ecology* 19:4678-4694

Supplementary Information

Similar recruitment timing with differential success between one alien tunicate and its native congener – competitive interactions in early stages

Sarah Bouchemousse^{1, 2*}, Laurent Lévêque^{1, 3} and Frédérique Viard^{1, 2*}

Table S1. (a) **Relative proportion of the non-native species, *Ciona robusta*, as compared to the native species *Ciona intestinalis*, recorded in spring and autumn in 2012, 2013 and 2014** with the average value over the whole study period (data from Bouchemousse et al. 2015). Bouchemousse et al. (2015) showed that the relative proportion is varying across seasons, with high values observed locally in autumn only. (b) **Density (number of individuals per m², mean \pm standard deviation) of *C. robusta* and *C. intestinalis*** recorded under 2 adjacent pontoons located close to experimental panels (using 10 quadrats of 40 x 25 cm along a 50 meters-long transect with one quadrat every 5m) in the four marinas surveyed. Density values were recorded in spring and autumn 2014 (S. Bouchemousse, L. Lévêque, G. Dubois, F. Viard, unpublished data).

(a)

Site	Spring 2012	Autumn 2012	Spring 2013	Autumn 2013	Spring 2014	Autumn 2014	Mean - Spring	Mean - Autumn	Overall Mean
Moulin Blanc	18.5	42.7	35.8	2.2	0.3	0	18.2	15.0	16.6
Château	3.4	19.1	0	6	0	3.3	1.1	9.5	5.3
Roscoff	8.8	2.5	0	0	0	0	2.9	0.8	1.9
Trébeurden	6.6	61.1	6.7	43.2	6.4	16.4	6.6	40.2	23.4

(b)

Site	Spring 2014 (May)		Autumn 2014 (October)	
	<i>C. robusta</i>	<i>C. intestinalis</i>	<i>C. robusta</i>	<i>C. intestinalis</i>
Moulin Blanc	0	30 \pm 22	31 \pm 39	1280 \pm 474
Château	0.5 \pm 2	195 \pm 127	120 \pm 112	1338 \pm 491
Roscoff	0	70 \pm 73	0	859 \pm 490
Trébeurden	11 \pm 25	305 \pm 164	108 \pm 80	556 \pm 413

Table S2. **Dataset obtained in 2011, 2012 and early 2013 in the marina of Moulin Blanc**

For each panel series, retrieved in Moulin Blanc between December 2010 (month no.0) and February 2013 (month no.26), the table gives the density (number per dm²) of juveniles per panel (P1, P2, P3).

Site	Month	Density (number per dm ²) of juveniles per panel		
		P1	P2	P3
Moulin Blanc	0-Dec-10	7.1	1.0	10.2
	1-Jan-11	4.1	5.1	2.0
	2-Feb-11	0.0	0.0	0.0
	3-Mar-11	0.0	0.0	0.0
	4-Apr-11	19.4	23.5	35.7
	5-May-11	83.7	117.3	140.8
	6-Jun-11	564.2	1115.2	1212.1
	7-Jul-11	589.7	655.0	489.7
	8-Aug-11	8.2	12.2	39.8
	9-Sep-11	55.1	57.1	57.1
	10-Oct-11	3.1	7.1	17.3
	11-Nov-11	147.9	10.2	107.1
	12-Dec-11	0.0	0.0	0.0
	13-Jan-12	0.0	0.0	0.0
	14-Feb-12	0.0	0.0	1.0
	15-Mar-12	1.0	2.0	0.0
	16-Apr-12	88.8	83.7	73.5
	17-May-12	12.2	35.7	25.5
	18-Jun-12	54.1	88.8	92.8
	19-Jul-12	9.2	23.5	45.9
	20-Aug-12	13.3	10.2	15.3
	21-Sep-12	97.9	115.3	89.8
	22-Oct-12	2.0	3.1	2.0
	23-Nov-12	0.0	0.0	2.0
	24-Dec-12	0.0	0.0	1.0
	25-Jan-13	1.0	0.0	0.0
	26-Feb-13	0.0	0.0	0.0

Table S3. **Detailed dataset obtained in 2013 and 2014 in the four study marinas**

For each marina and for each panel series retrieved between March 2013 (month no.27) and March 2015 (month no.51), the table provides the density (number per dm²) of juveniles per panel (P1, P2, P3), the number of juveniles used for DNA-based species identification and the associated genotyping success, the relative proportion of *C. robusta* juveniles amongst *Ciona* sp. juveniles per panel (note that for a few months, the sampled juveniles collected were not separated per panel and only the value over the three panels is provided (in italics)). The *P*-value testing the departure of the relative proportion of the two species from balanced proportion of 0.5:0.5 (using a binomial test in R) is given with significant *P*-values in bold. The density of *C. intestinalis* and *C. robusta* juveniles per panel was computed from the juveniles density cumulated over the two species and the relative proportion of the two species at the juvenile stage.

Site	Month	Density (number per dm ²) of juveniles per panel			Number of juveniles genotyped		Relative proportion of <i>C. robusta</i> juveniles amongst <i>Ciona</i> spp. juveniles					Density (number of juveniles per dm ²) of <i>C. robusta</i>		
		P1	P2	P3	Nind	% of success	P1	P2	P3	Total	<i>P</i> -value	P1	P2	P3
Moulin Blanc	27-Mar-13	1.0	0.0	0.0										
	28-Apr-13	3.1	3.1	0.0	3	0.0%								
	29-May-13	28.6	40.8	35.7	30	96.7%	0%	10%	0%	3%	<0.001	0.0	4.1	0.0
	30-Jun-13	591.8	264.3	376.5	51	84.3%				7%	<0.001	41.3	18.4	26.3
	31-Jul-13	119.6	166.5	31.0	69	92.8%				16%	<0.001	18.7	26.0	4.8
	32-Aug-13	8.2	1.0	1.0	10	100.0%	0%	0%	0%	0%	0.002	0.0	0.0	0.0
	33-Sep-13	57.1	18.4	17.3	40	97.5%	25%	8%	0%	10%	<0.001	14.3	1.5	0.0
	34-Oct-13	28.6	32.6	57.1	12	58.3%		0%		0%	0.016		0.0	
	35-Nov-13	0.0	0.0	0.0										
	36-Dec-13	0.0	0.0	1.0										
	37-Jan-14	0.0	0.0	0.0										
	38-Feb-14	0.0	0.0	0.0										
	39-Mar-14	0.0	0.0	0.0										
	40-Apr-14	4.1	2.0	2.0	4	0.0%								
	41-May-14	74.5	89.9	68.4	45	51.1%	0%	0%	0%	0%	<0.001	0.0	0.0	0.0
	42-Jun-14	125.1	120.4	63.3	47	91.5%	6%	7%	8%	7%	<0.001	7.8	8.6	4.9
	43-Jul-14	586.7	717.3	523.4	47	100.0%	0%	6%	0%	2%	<0.001	0.0	44.8	0.0
	44-Aug-14	2.0	8.2	0.0	8	75.0%		0%		0%	0.031		0.0	
	45-Sep-14	6.1	14.3	5.1										
	46-Oct-14	414.2	354.0	440.8	45	100.0%	7%	13%	7%	9%	<0.001	27.6	47.2	29.4
	47-Nov-14	3.1	31.6	1.8	12	0.0%								
	48-Dec-14	8.2	1.0	7.1										
	49-Jan-15	0.0	0.0	3.1										
	50-Feb-15	0.0	0.0	0.0										
	51-Mar-15	0.0	0.0	0.0										
Château	27-Mar-13	0.0	0.0	0.0										
	28-Apr-13	2.0	0.0	1.0										
	29-May-13	31.6	20.4	15.3	20	95.0%	0%	0%	0%	0%	<0.001	0.0	0.0	0.0
	30-Jun-13	296.9	263.2	352.0	57	89.5%				2%	<0.001	5.8	5.2	6.9
	31-Jul-13	313.2	798.9	647.4	57	89.5%				6%	<0.001	18.4	47.0	38.1
	32-Aug-13	230.6	126.5	230.6	30	96.7%	10%	0%	10%	7%	<0.001	23.1	0.0	23.1
	33-Sep-13	1142.7	618.6	244.9	57	100.0%	0%	14%	18%	9%	<0.001	0.0	88.4	43.2
	34-Oct-13	844.8	606.1	838.7	57	89.5%	13%	6%	6%	8%	<0.001	105.6	33.7	49.3
	35-Nov-13	330.6	453.0	372.4	20	90.0%		11%	33%	22%	0.031		50.3	124.1

	36-Dec-13	0.0	0.0	0.0										
	37-Jan-14	0.0	2.0	0.0										
	38-Feb-14	0.0	0.0	0.0										
	39-Mar-14	0.0	0.0	0.0										
	40-Apr-14	1.0	1.0	0.0	2	0.0%								
	41-May-14	219.4	227.5	170.4	46	17.4%	0%	0%	0%	0%	0.008	0.0	0.0	0.0
	42-Jun-14	526.5	343.8	347.9	50	96.0%	0%	0%	13%	4%	<0.001	0.0	0.0	43.5
	43-Jul-14	259.2	617.2	258.1	45	100.0%	0%	0%	13%	4%	<0.001	0.0	0.0	34.4
	44-Aug-14	614.2	738.7	680.5	46	100.0%	0%	13%	6%	7%	<0.001	0.0	98.5	42.5
	45-Sep-14	118.4	96.9	62.2	50	50.0%	6%	13%	100%	12%	<0.001	7.4	12.1	62.2
	46-Oct-14	1010.1	1461.1	1307.0	45	100.0%	33%	33%	20%	29%	0.007	336.7	487.0	261.4
	47-Nov-14	233.6	234.7	300.0	46	100.0%	40%	38%	40%	39%	0.184	93.5	88.0	120.0
	48-Dec-14	35.7	44.9	50.0	45	84.4%	58%	55%	67%	61%	0.226	20.8	24.5	33.3
	49-Jan-15	3.1	4.1	2.0										
	50-Feb-15	1.0	0.0	0.0										
	51-Mar-15	0.0	0.0	0.0										
Roscoff	27-Mar-13	0.0	0.0	0.0										
	28-Apr-13	0.0	0.0	0.0										
	29-May-13	1.0	1.0	1.0	2	100.0%	0%		0%	0%		0.0		0.0
	30-Jun-13	77.5	44.9	40.8	57	91.2%	0%	0%	0%	0%		0.0	0.0	0.0
	31-Jul-13	33.7	29.6	27.5	57	100.0%	0%	0%	0%	0%		0.0	0.0	0.0
	32-Aug-13	27.5	12.2	37.8	30	100.0%	0%	0%	0%	0%		0.0	0.0	0.0
	33-Sep-13	40.8	5.1	8.2	23	100.0%	0%	0%	0%	0%		0.0	0.0	0.0
	34-Oct-13	18.4	23.5	25.5	25	84.0%	0%	0%	0%	0%		0.0	0.0	0.0
	35-Nov-13	0.0	0.0	0.0										
	36-Dec-13	0.0	0.0	1.0										
	37-Jan-14	0.0	0.0	0.0										
	38-Feb-14	0.0	0.0	0.0										
	39-Mar-14	0.0	0.0	0.0										
	40-Apr-14	0.0	0.0	0.0										
	41-May-14	1.0	0.0	0.0	1	0.0%								
	42-Jun-14	0.0	1.0	0.0	1	0.0%								
	43-Jul-14	10.2	6.1	10.2	23	95.7%	0%	0%	0%	0%		0.0	0.0	0.0
	44-Aug-14	7.1	9.2	3.1	10	20.0%	0%	0%		0%		0.0	0.0	
	45-Sep-14	30.6	27.5	33.7	32	100.0%		0%	0%	0%			0.0	0.0
	46-Oct-14	31.6	20.4	20.4	45	57.8%	0%	0%		0%		0.0	0.0	0.0
	47-Nov-14	0.0	0.0	1.0	1	0.0%								
	48-Dec-14	2.0	1.0	0.0	2	100.0%				0%				0.0
	49-Jan-15	0.0	0.0	0.0										
	50-Feb-15	0.0	0.0	0.0										
	51-Mar-15	0.0	0.0	0.0										
Trébeurden	27-Mar-13	1.0	0.0	0.0										
	28-Apr-13	0.0	1.0	0.0										
	29-May-13	3.1	1.0	1.0	2	50.0%		0%		0%			0.0	
	30-Jun-13	5.1	17.3	13.3	20	80.0%	0%	0%	0%	0%	<0.001	0.0	0.0	0.0
	31-Jul-13	26.5	40.8	72.4	63	84.1%	25%	27%	17%	23%	<0.001	6.6	10.9	12.1

32-Aug-13	18.4	20.4	26.5	49	95.9%	29%	53%	50%	45%	0.560	5.2	10.9	13.3
33-Sep-13	3.9	12.7	18.0	19	78.9%	0%	0%	33%	20%	0.036	0.0	0.0	6.0
34-Oct-13	217.3	181.6	171.4	79	97.5%	30%	27%	46%	34%	0.006	64.4	48.9	78.6
35-Nov-13	24.5	19.4	58.2	18	100.0%	0%	0%	25%	17%	0.008	0.0	0.0	14.5
36-Dec-13	2.0	0.0	1.0										
37-Jan-14	0.0	0.0	0.0										
38-Feb-14	0.0	0.0	0.0										
39-Mar-14	0.0	0.0	0.0										
40-Apr-14	0.0	0.0	0.0										
41-May-14	3.1	3.1	0.0	6	50.0%		33%		33%	1		1.0	
42-Jun-14	12.2	9.6	14.9	23	39.1%	0%	25%	0%	11%	0.039	0.0	2.4	0.0
43-Jul-14	4.1	4.1	9.2	21	95.2%	20%	40%	20%	25%	0.041	0.8	1.6	1.8
44-Aug-14	69.4	86.7	80.6	48	100.0%	13%	6%	13%	10%	<0.001	8.7	5.4	10.1
45-Sep-14	58.2	142.8	65.3	45	97.8%	29%	60%	33%	41%	0.29	16.6	85.7	21.8
46-Oct-14	41.8	59.2	19.4	44	88.6%	73%	67%	44%	64%	0.11	30.7	39.5	8.6
47-Nov-14	25.5	91.8	63.3	41	100.0%	100%	100%	87%	95%	<0.001	25.5	91.8	54.8
48-Dec-14	11.2	9.2	4.1	17	100.0%	100%	100%	100%	100%	<0.001	11.2	9.2	4.1
49-Jan-15	1.0	0.0	0.0										
50-Feb-15	0.0	0.0	0.0										
51-Mar-15	0.0	0.0	0.0										

Table S4. **Parameters of the Gaussian curves, estimated with the R package MIXDIST, describing the annual settlement dynamics of *Ciona* spp. in the four study marinas.**

Modal decompositions were carried out for each year independently. Values for the proportion, mode and standard deviation (SD) are provided for each of the two Gaussian curves that were shown to provide the best fit with the observed data for each year (Fig. S1). The unit for the mode and SD is month from to 1 (January of year n) to 13 (January of year $n+1$). The goodness of fit was tested with a χ^2 test (df: degrees of freedom, χ^2 : value of the statistic, P -value: probability associated with the χ^2 test).

Year	Marina	Parameters	Modal decomposition		χ^2 statistic
			1	2	
2011	Moulin Blanc	Proportion	0.93	0.07	df = 7
		Mode	5.81	10.13	$\chi^2 = 9.63$
		SD	0.97	0.87	P -value = 0.16
2012	Moulin Blanc	Proportion	0.65	0.35	df = 5
		Mode	4.76	8.40	$\chi^2 = 8.43$
		SD	1.33	0.79	P -value = 0.30
2013	Trébeurden	Proportion	0.26	0.74	df = 6
		Mode	6.64	9.59	$\chi^2 = 2.29$
		SD	1.11	0.81	P -value = 0.90
	Roscoff	Proportion	0.55	0.45	df = 6
		Mode	5.83	8.38	$\chi^2 = 2.53$
		SD	0.82	1.16	P -value = 0.87
	Moulin Blanc	Proportion	0.89	0.11	df = 6
		Mode	5.64	9.08	$\chi^2 = 3.98$
		SD	0.84	0.84	P -value = 0.68
	Château	Proportion	0.37	0.63	df = 6
		Mode	6.37	9.30	$\chi^2 = 10.09$
		SD	1.00	1.04	P -value = 0.10
2014	Trébeurden	Proportion	0.41	0.59	df = 6
		Mode	6.84	8.39	$\chi^2 = 11.53$
		SD	1.53	1.28	P -value = 0.08
	Roscoff	Proportion	0.21	0.79	df = 6
		Mode	6.76	8.99	$\chi^2 = 0.72$
		SD	0.67	0.27	P -value = 0.99
	Moulin Blanc	Proportion	0.68	0.32	df = 6
		Mode	6.28	9.63	$\chi^2 = 6.21$
		SD	1.05	0.72	P -value = 0.48
	Château	Proportion	0.48	0.52	df = 6
		Mode	6.41	9.53	$\chi^2 = 9.68$
		SD	1.33	0.97	P -value = 0.16

Table S5. **Parameters of Gaussian curves, estimated with the R package MIXDIST, describing the annual settlement dynamic of *Ciona robusta* (a) and *C. intestinalis* (b) in 2013 and 2014 in the three marinas where the two species were found living in syntopy (i.e. Trébeurden, Moulin Blanc and Château). Modal decompositions were carried out for each year independently. Values for the proportion, mode and standard deviation (SD) are provided for each of the two Gaussian curves that were shown to provide the best fit with the observed data for each year (Fig. S1). The unit for the mode and SD is month from to 1 (January of year n) to 13 (January of year $n+1$). The goodness of fit was tested with a χ^2 test (df: degree of freedom, χ^2 : value of the statistic, P -value: probability associated with the χ^2 test).**

(a)

Year	Marina	Parameters	Modal decomposition		χ^2 statistic
			1	2	
2013	Trébeurden	Proportion	0.18	0.82	df = 4
		Mode	6.82	9.47	$\chi^2 = 0.91$
		SD	0.74	0.77	P -value =0.923
	Moulin Blanc	Proportion	0.88	0.12	df = 4
		Mode	5.80	8.26	$\chi^2 = 0.62$
		SD	0.84	0.79	P -value =0.961
	Château	Proportion	0.31	0.69	df = 6
		Mode	6.96	9.70	$\chi^2 = 4.07$
		SD	1.03	0.96	P -value =0.667
2014	Trébeurden	Proportion	0.26	0.74	df = 9
		Mode	7.93	10.24	$\chi^2 = 4.34$
		SD	0.76	0.98	P -value =0.887
	Moulin Blanc	Proportion	0.38	0.62	df = 5
		Mode	6.20	9.50	$\chi^2 = 1.48$
		SD	0.82	0.68	P -value =0.915
	Château	Proportion	0.07	0.93	df = 6
		Mode	6.41	9.64	$\chi^2 = 2.68$
		SD	0.93	0.95	P -value =0.846

(b)

Year	Marina	Parameters	Modal decomposition		χ^2 statistic
			1	2	
2013	Trébeurden	Proportion	0.26	0.74	df = 6
		Mode	6.42	9.59	$\chi^2 = 0.87$
		SD	0.96	0.83	P -value =0.989
	Moulin Blanc	Proportion	0.88	0.12	df = 5
		Mode	5.62	9.12	$\chi^2 = 5.11$
		SD	0.82	0.81	P -value =0.402
	Château	Proportion	0.39	0.62	df = 6
		Mode	6.34	9.26	$\chi^2 = 7.69$
		SD	0.99	1.04	P -value =0.206
2014	Trébeurden	Proportion	0.09	0.91	df = 8
		Mode	5.33	8.13	$\chi^2 = 4.72$
		SD	0.74	1.13	P -value =0.678
	Moulin Blanc	Proportion	0.72	0.28	df = 6
		Mode	6.30	9.6	$\chi^2 = 6.36$
		SD	1.06	0.58	P -value =0.493
	Château	Proportion	0.59	0.41	df = 7
		Mode	6.50	9.60	$\chi^2 = 8.55$
		SD	1.37	0.89	P -value =0.271

Figure S1. **Decomposition of normal distributions for determining the number and properties of each major settlement event of *Ciona* sp. in 2013 and 2014 in the four study marinas, with two additional years (2011, 2012) for Moulin Blanc.** The blue line (histogram) corresponds to the observed dataset (i.e. distribution of the density of juveniles for each month). The values were averaged per panel ($n = 3$ replicates) and smoothed using a running average over 3 classes (i.e. 3 months). Result of Shapiro-Wilk test (W : value of the statistic, P : probability) testing for the deviation of the observed data from a normal distribution are provided: every distribution is significantly different from a normal distribution. Red and green curves represent the outcome of the modal decomposition analysis, and correspond to the Gaussian curves identified and the final adjusted curve, respectively. Numbers on the x-axis indicate months starting at 0 (for December) and ending at 15 (which stands for March of the next year). Note that 0, 1, 2, 14 and 15 values on the X-axis in the graphs have no data. Characteristics of each Gaussian curve are detailed in Table S4. Computations were made with the R package MIXDIST.

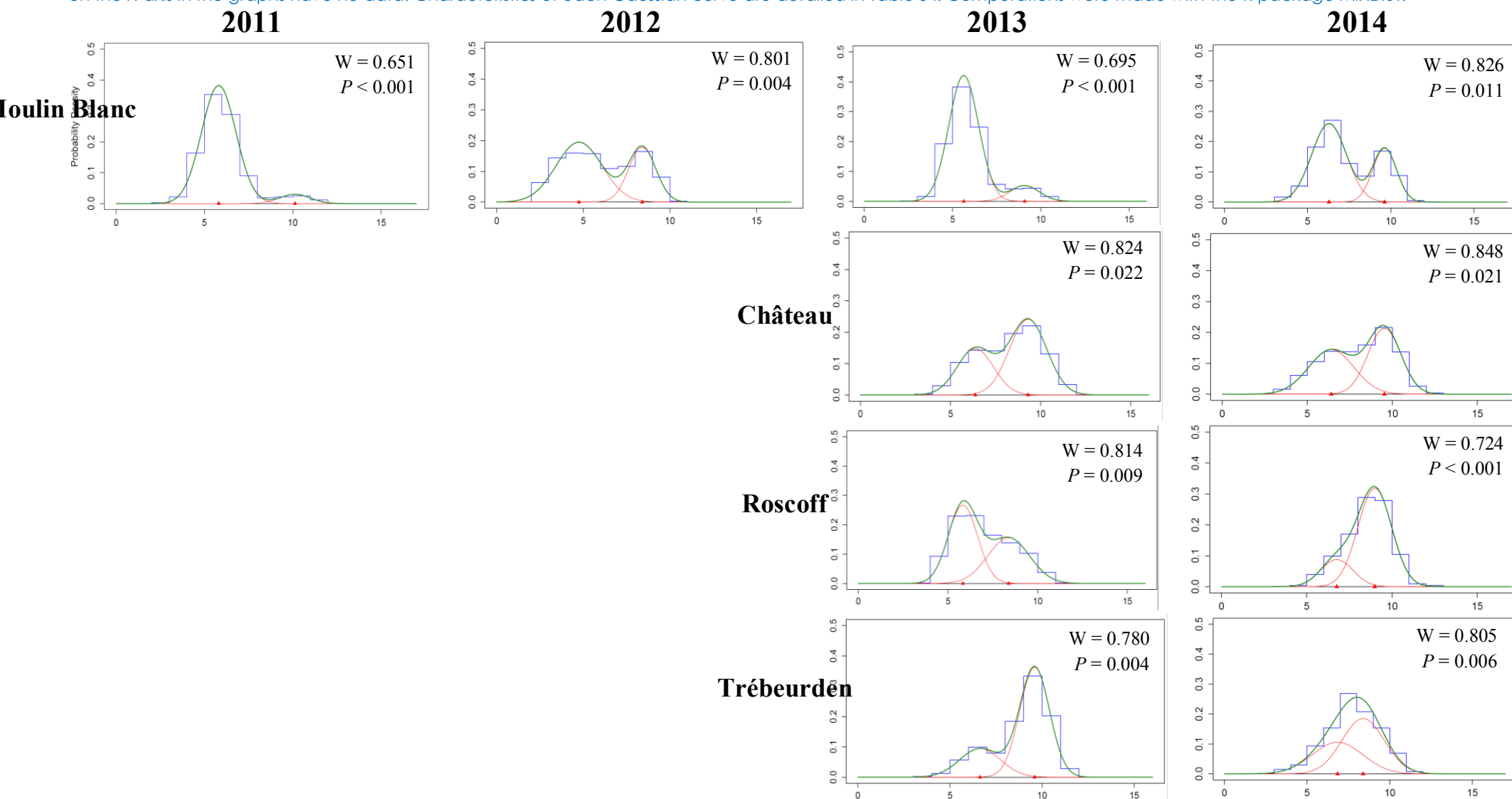
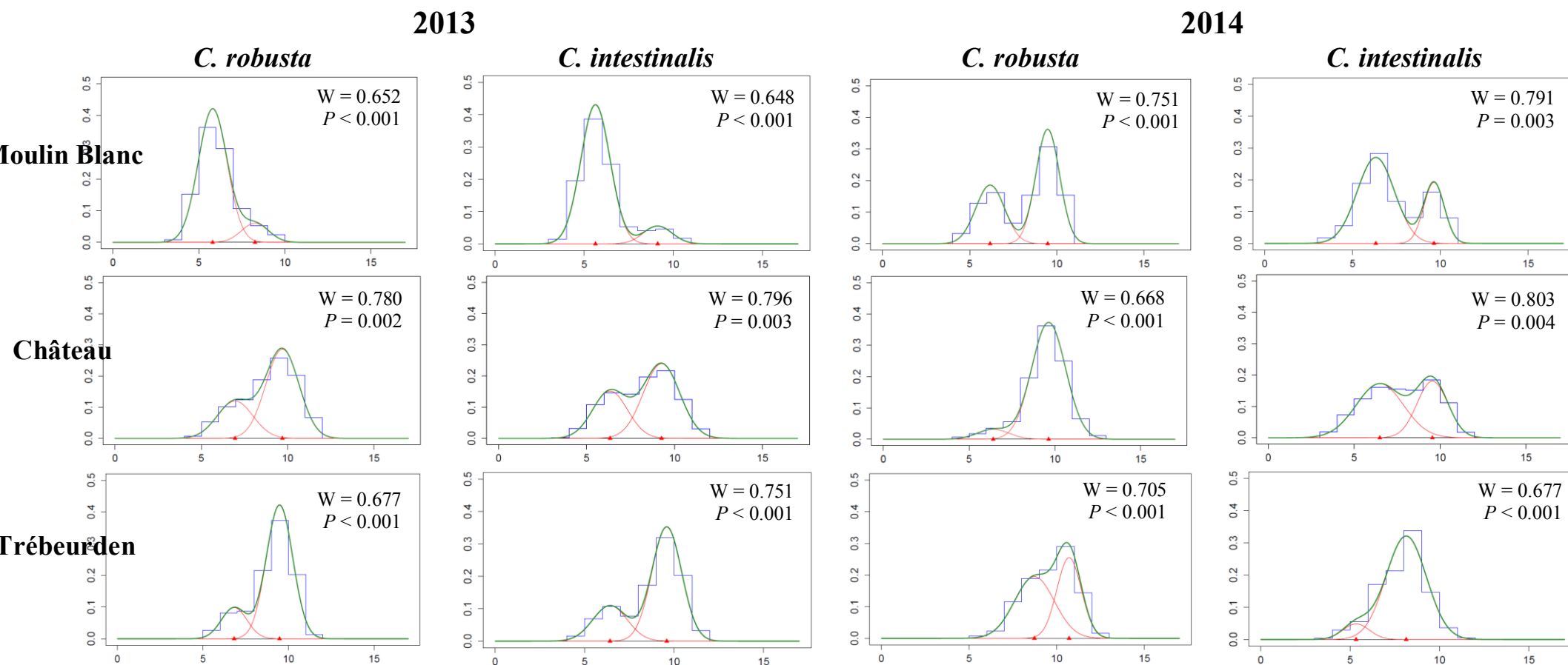


Figure S2. Decomposition of normal distributions for determining the number and properties of each major settlement event of *Ciona robusta* and *C. intestinalis* in 2013 and 2014 in the three marinas where the two species were found living in syntopy (i.e. Trébeurden, Moulin Blanc and Château). The blue line (histogram) corresponds to the observed dataset (i.e. distribution of the density of juveniles for each month). The values were averaged per panels (n=3 replicates) and smoothed using a running average over 3 classes (i.e. 3 months). Result of Shapiro-Wilk test (W: value of the statistic, P: probability) testing for the deviation of the observed data from a normal distribution are provided: all distribution are significantly different from a normal distribution. Red and green curves which display the outcome of the modal decomposition analysis correspond to the Gaussian curves and the final adjusted curve, respectively. Numbers on the X-axis indicate months starting by 0 (for December) and ending at 15 (which stands for March of the next year). Note that 0, 1, 2, 14 and 15 values on the X-axis in the graphs have no data. Characteristics of each Gaussian curves are detailed in Table S5. Computations were made with the R package MIXDIST.



- Chapitre 3 -

Quelle est le potentiel d'hybridation entre les deux espèces dans la zone de sympatrie ?

I. Contexte et synopsis de l'étude

Dans l'étude présentée dans le chapitre 1, nous avons mis en évidence la présence simultanée (y compris au sein d'un même cadrat de 20 x 25cm) de *Ciona intestinalis* et *C. robusta* dans de nombreuses localités bretonnes. Le chapitre 2 a par ailleurs permis de montrer que les deux espèces présentent globalement une même dynamique annuelle, avec deux évènements principaux de sédentarisation par an. Comme détaillé dans l'introduction, il a été montré en laboratoire que les deux espèces étudiées ne sont que partiellement isolées reproductivement (Suzuki *et al.* 2005). Dans ce contexte, nous avons cherché à documenter plus précisément le potentiel d'hybridation entre les deux espèces en milieu naturel. Obtenir des éléments concernant 1) leur coexistence saisonnière et annuelle, à l'état adulte, et 2) le synchronisme de la maturité sexuelle chez les deux espèces est en effet nécessaire pour aborder la question de la possible hybridation entre *C. robusta* et *C. intestinalis* dans la zone de sympatrie. En parallèle, il nous est apparu intéressant de rechercher des signes d'hybridation dans les populations étudiées, en utilisant quelques marqueurs considérés comme diagnostiques des deux espèces. En effet, une étude antérieure, réalisée par Nydam & Harrison (2011) permettait déjà de documenter les schémas de co-existence et apportait des éléments quant à la possibilité d'hybridation entre les deux espèces en Manche, basée sur 6 marqueurs diagnostiques des deux espèces. Cette étude avait mis en évidence 1) des individus porteurs d'allèles diagnostiques des deux espèces, interprétés comme de possibles hybrides ; ces individus ne représentaient cependant que 4.2% des individus étudiés (Figure 3.1), 2) la disparition de *C. robusta* dans l'échantillonnage réalisé en 2009, deux ans après leur premier échantillonnage (Figure 4.1).

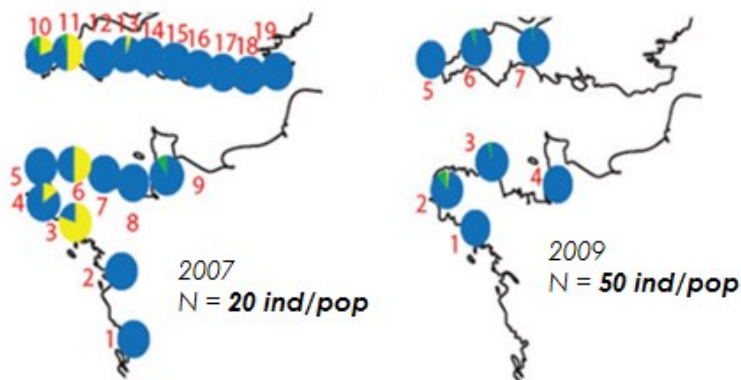


Figure 3.1. Proportion relative de *C. robusta* (en jaune), *C. intestinalis* (en bleu) et des individus montrant des profils mixtes (i.e. possédant des allèles des deux espèces, en vert) en 2007 et 2009. Figure tirée de Nydam & Harrison (2011) et présentée dans l'introduction générale de ce manuscrit.

Une des explications proposées par les auteurs était une instabilité des populations de *C. robusta* conduisant à sa disparition (i.e. non réussite de l'introduction), avec quelques gènes de *C. robusta* persistant dans des individus de *C. intestinalis* introgressés. Cependant, les observations réalisées à la Station Biologique de Roscoff avant cette thèse, notamment dans le cadre du programme Européen ASSEMBLE, n'allaient pas dans ce sens : des individus de *C. robusta* avaient en effet été observés en 2010-2011, particulièrement en fin d'été. Nous avons émis l'hypothèse que *C. robusta* pouvait être rare et que les résultats de Nydam & Harrison (2011) pouvait s'expliquer par un effet de taille d'échantillonnage (< 50 individus) et de saison d'échantillonnage (mai-juin) dans leur étude. Cette hypothèse est d'ailleurs soutenue par les mesures de densité de *C. robusta*, présentée dans le chapitre 1 et l'observation d'un accroissement des juvéniles de *C. robusta* en fin d'été (chap. 2).

L'objectif de cette étude était donc triple : 1) évaluer l'abondance relative des deux espèces localement et les éventuelles variations d'abondance entre les deux générations annuelles, 2) observer leur synchronie de maturité sexuelle et donc leur potentiel de fécondation *in situ* et 3) mesurer la proportion d'individus possiblement hybrides (i.e. les flux de gènes interspécifiques). Cette étude a fait l'objet d'un article sous presse dans la revue *Evolutionary Ecology*, présenté en section II de ce chapitre et résumé ci-dessous.

Pour répondre à nos objectifs, nous avons réalisé des échantillonnages sur six générations distinctes, pendant 3 années successives (2012 à 2014), dans 11 ports de plaisances distribués le long des côtes bretonnes. Les deux périodes d'échantillonnages choisies correspondent à chacune des deux générations identifiées précédemment (chap. 2) : une génération dite « printanière » (simultanée du premier pic de sédentarisation des juvéniles en Mai-Aout) et une génération dite « automnale » (simultanée du second pic de sédentarisation de juvéniles en Septembre-Novembre). Pour chaque site et période d'échantillonnage, une moyenne de 376 (\pm 200) individus adultes de *Ciona* ont été échantillonnés aléatoirement sous deux pontons en plongée (Figure 3.2.A) et les deux espèces identifiées morphologiquement selon les critères diagnostiques établis par Sato *et al.* (2012) (cf. Encadré 8 du chapitre 1). A partir de cet échantillonnage, un minimum de 40 individus adultes par espèce (quand l'abondance le permettait) a été sous-échantillonné aléatoirement (Figure 3.2.B) pour 1) établir l'état de maturité (absence de gamètes, présence de sperme, présence de sperme et d'ovocytes, Encadré 9) et 2) déterminer les génotypes à l'aide d'un locus mitochondrial (COX1, Nydam & Harrison 2007) et trois locus nucléaires (Caputi *et al.* 2007; Nydam & Harrison 2010) diagnostiques par visualisation sur gel d'agarose après PCR ou PCR-RFLP.

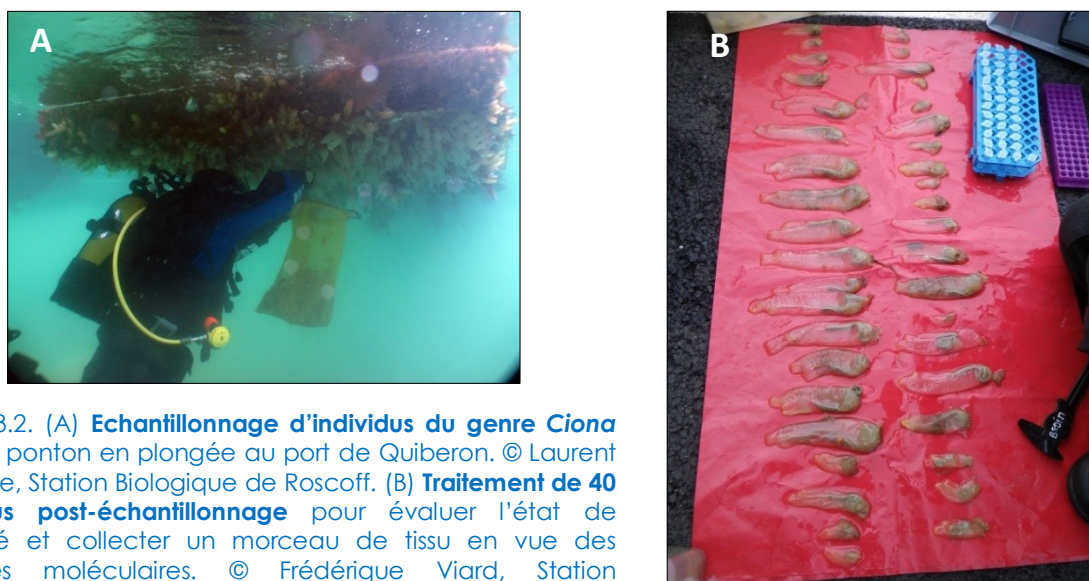


Figure 3.2. (A) **Echantillonnage d'individus du genre *Ciona*** sous un ponton en plongée au port de Quiberon. © Laurent Lévêque, Station Biologique de Roscoff. (B) **Traitement de 40 individus post-échantillonnage** pour évaluer l'état de maturité et collecter un morceau de tissu en vue des analyses moléculaires. © Frédérique Viard, Station Biologique de Roscoff.

Encadré 9. Evaluation du stade reproducteur des individus de *C. robusta* et *C. intestinalis*

Comme présenté dans l'introduction, *C. robusta* et *C. intestinalis* sont des espèces hermaphrodites simultanées, caractérisées par une légère protandrie : les gamètes mâles sont produits en premier, puis les gamètes femelles pendant que la production des gamètes mâles se poursuit. Les gamètes mâles et femelles apparaissent rapidement au cours du cycle de vie. En laboratoire, la maturité sexuelle (présence des deux types de gamètes) est atteinte en 3 mois à 18°C. Les premières études de Millar (1952) sur la croissance et la maturité de *C. intestinalis* suggère que la taille critique de la production de sperme est d'environ 25 mm et de la production des ovocytes au environ de 30 mm (Figure E9.1).

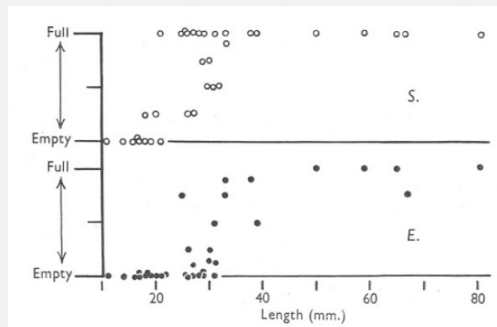


Figure E9.1. Relation entre la taille des individus et la quantité de sperme et d'ovocytes observés dans les spermiductes et oviductes d'individus prélevés en Mai 1950 échantillonnés à Ardrossan en Ecosse. Figure tirée de Millar (1952).

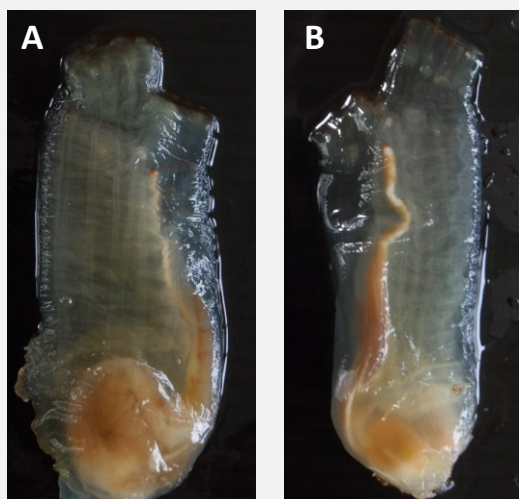


Figure E9.2. **Stade de reproduction de *C. robusta*.** La photographie A présente un individu possédant uniquement du sperme et la photographie B, un individu présentant les deux types de gamètes. © Gaëtan Schires, Station Biologique de Roscoff.

De par l'apparition séquentielle des gamètes au cours du cycle de vie, trois stades ont été établis, par description semi-quantitative de la maturité des individus, pour évaluer la synchronie de reproduction entre les deux espèces :

- Stade 0 : l'individu ne présente aucun gamète
- Stade 1 : l'individu présente du sperme. Ce stade est généralement facile à distinguer par la couleur blanche du spermiducte (Figure E9.2.A).
- Stade 2 : l'individu présente du sperme et des ovocytes. Lorsqu'ils sont nombreux les ovocytes sont faciles à distinguer, ils forment une masse orange dans l'oviducte (Figure E9.2.B).

Les individus prélevés dans le cadre de l'étude présentée dans ce chapitre ont été retiré de leur tunique externe pour faciliter l'observation des gamètes et donc l'évaluation du stade reproducteur et pour permettre le prélèvement d'un morceau de tissu en vue du diagnostic moléculaire.

Les identifications morphologiques réalisées sur le terrain sur un total de 23000 individus indiquent une coexistence annuelle stable entre les deux espèces. On observe cependant une variation saisonnière significative de l'abondance relative des deux espèces entre la génération printanière et automnale : à l'échelle régionale, et souvent à l'échelle locale, l'abondance relative de *C. robusta* est plus élevée à la génération automnale qu'à la génération printanière. Cette variation saisonnière suggère des préférences environnementales différentes entre les deux espèces, notamment en termes de température et salinité. Les données obtenues sur l'état reproducteur indiquent la présence d'une majorité d'individus sexuellement matures produisant des gamètes, chez les deux espèces et quelle que soit la période. Ce résultat suggère une reproduction synchrone entre les deux espèces à chacune des six périodes étudiées. L'interfertilité en laboratoire (vérifiée dans cette étude avec des individus prélevés en Bretagne), la coexistence et la présence d'adultes reproducteurs indiquent un potentiel de croisements interspécifique élevé. Mais ce potentiel ne semble pas se réaliser en milieu naturel comme l'indique les résultats de notre étude moléculaire : sur l'ensemble de l'étude, 3048 individus ont été analysés avec les

marqueurs moléculaires diagnostiques, et seulement 4.3% des individus présentent des allèles des deux espèces (donc un génotype compatible avec un état d'hybride). Par ailleurs, un seul individu montre un profil en adéquation avec le génotype attendu pour un hybride de première génération (i.e. hétérozygote aux trois locus nucléaire). Cet individu présentait une morphologie déjà observée chez des hybrides F1 obtenus en laboratoire, à savoir une corolle orange (voire rouge) continue autour des siphons (Figure 3.3).

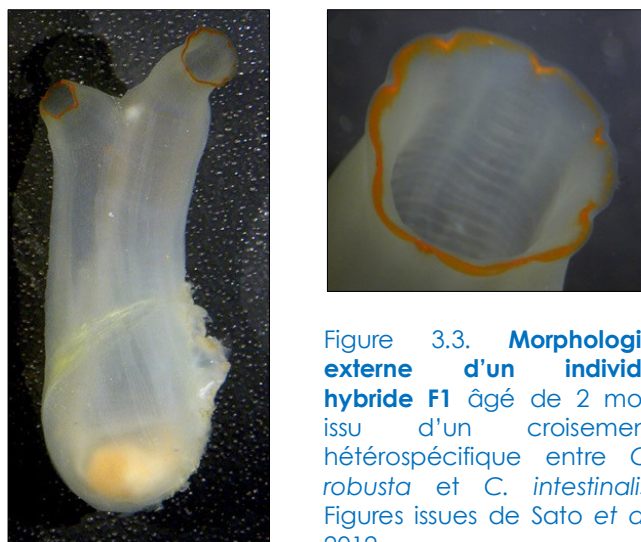


Figure 3.3. **Morphologie externe d'un individu hybride F1** âgé de 2 mois issu d'un croisement hétérospécifique entre *C. robusta* et *C. intestinalis*. Figures issues de Sato et al. 2012.

Ainsi, ces résultats indiquent l'existence très probable d'importantes barrières génétiques pré- ou post- zygotiques en milieu naturel. Ces barrières pourraient par exemple être une compétition gamétique favorisant les croisements intraspécifiques ou une contre sélection des hybrides F1 en milieu naturel à des stades précoces du cycle de vie. Par ailleurs, les rares flux de gènes interspécifiques observés en milieu naturel ont été majoritairement observés chez des individus présentant une lignée maternelle de *C. robusta* (i.e. identifiée grâce au marqueur mitochondrial utilisé) suggérant des croisements hétérospécifiques impliquant des gamètes femelles de l'espèce non-indigène en milieu naturel. Or, ce résultat est discordant avec les données obtenues à partir des croisements expérimentaux montrant de très faibles taux de fécondation dans le sens de croisement impliquant des ovocytes de *C. robusta*. Ainsi, compte-tenu de nos résultats, de ceux obtenus par Nydam & Harrison (2011) et de l'étude de Roux et al. (2013) indiquant qu'un contact secondaire ancien (i.e. estimé entre 5,400 et 56,800 ans) a eu lieu entre les deux espèces étudiées, nous avons émis l'hypothèse que la majorité des flux de gènes observés entre les deux espèces pourrait être le résultat d'introgressions anciennes et non pas contemporaines entre les deux espèces.

Cette étude a été réalisée en collaboration avec Laurent Lévêque de la Fédération de Recherche FR2424 de la Station Biologique de Roscoff. Guillaume Dubois a également largement contribué à ce travail dans le cadre d'un stage long pour l'obtention d'un Diplôme Universitaire de l'Université de Bretagne Occidentale (Avril à Septembre 2013). Une partie des données est issue du stage de Master 1 de Morgan Daniello de l'Institut Universitaire Européen de la Mer (Janvier à Février 2014).

Ces travaux ont été présentés sous la forme d'une présentation orale à plusieurs congrès nationaux et internationaux dont le congrès annuel de la British Ecological Society et la Société Française d'Ecologie (Décembre 2014, Lille, France), le colloque de Génomique Environnementale (Novembre 2013, Rennes, France), le 19^e congrès annuel des doctorants en Evolution (Septembre 2013, Falmouth, UK), etc.

II. Article 2

Co-occurrence and reproductive synchrony do not ensure hybridization between an alien tunicate and its interfertile native congener

Sarah Bouchemousse^{1, 2*}, Laurent Lévêque^{1, 3}, Guillaume Dubois^{1, 2} and Frédérique Viard^{1, 2*}

¹ Sorbonne Universités, UPMC Univ Paris 6, UMR 7144, Station Biologique de Roscoff, Place Georges Teissier, 29680 Roscoff, France

² CNRS, UMR 7144, Equipe Div&Co, Station Biologique de Roscoff, Place Georges Teissier, 29680 Roscoff, France

³ CNRS, FR 2424, Station Biologique de Roscoff, Place Georges Teissier, 29680 Roscoff, France

*Current address : UMR7144, Equipe Diversité et Connectivité dans le paysage marin Côtier (Div&Co), CNRS-UPMC, Station Biologique de Roscoff, 29680 Roscoff, France

Email: sarah.bouchemousse@sb-roscoff.fr; viard@sb-roscoff.fr

**Sous presse dans le journal *Evolutionary Ecology*
DOI 10.1007/s10682-015-9788-1**

Abstract

Biological invasions can promote secondary contacts between related species and thus provide excellent case studies for investigating the joint ecological and evolutionary trajectories of interfertile taxa. Here, we studied two tunicates living in sympatry, and sometimes in syntopy, in the English Channel, *Ciona intestinalis* species A (presumed native to the NW Pacific) and species B (native to the N Atlantic). In addition to monitoring their co-existence over time, we examined the level of interspecific gene flow, a process that may increase the invasiveness of the non-native species. The sampling scheme was repeated twice a year for three years (6 distinct generations) to determine the relative abundance of the two species in 11 localities along the coasts of the English Channel and the Iroise Sea (covering 1600 km) in Brittany, France. We examined 23,000 individuals, including 5,315 specimens for which reproductive status was determined. Four species-diagnostic molecular markers traced interspecific gene flow on a random subset of 3,048 individuals. Regardless of the sampling date, the two species co-occurred in most of the study sites, with species A showing higher frequency in the autumn. The regional pattern of seasonal variation in relative abundance of the two congeners appears to correspond to different thermal growth optima. Abrupt variations in environmental parameters can act synergistically and may favor the non-native species locally. Despite syntopy, synchronous gamete production and successful *in vitro* interspecific crosses, only 4.3% individuals showed an admixed genome (i.e. footprint of present-day or past introgression events), most of them with a species A maternal lineage, of which only one was a putative first generation hybrid. Altogether, efficient barriers seem to prevent interspecific crosses between the two interfertile congeners in the wild: present-day hybridization may have less impact than competitive interactions on the fate of the two study species over their sympatric range.

Introduction

Biological introductions (i.e. transport of species away from their native range via human activities) are modifying species ranges at an unprecedented rate and on global scales (e.g. in the marine environment, Molnar et al. 2008). Among the various ecological and evolutionary consequences of species introduction, hybridization between native and non-native species can dramatically alter the evolutionary trajectories of both species (Allendorf et al. 2001). Hybridization *sensu lato* commonly refers to interspecific gene flow, including first-generation hybrids and repeated backcrossing of their offspring with parental species (Harrison 2012). Such interspecific gene flow between formerly allopatric taxa is not rare and can have diverse consequences (Allendorf et al. 2001), including an increased risk of extinction of the native species (Rhymer and Simberloff 1996; Fitzpatrick et al. 2010), increased invasiveness through, for instance, adaptive introgression mechanisms (Currat et al. 2008; Schierenbeck and Ellstrand 2009) and the emergence of new species (Abbott 1992). Hybridization facilitated by human activities has been studied mainly in plant species (e.g. Schierenbeck and Ellstrand 2009; Guo 2014) and to a lesser extent in animals (e.g. Fitzpatrick et al. 2010; Steeves et al. 2010), with only a few cases reported in marine systems (but see, for instance, *Abudefduf vaigiensis* and *A. abdominalis*, Coleman et al. 2014). However, marine species live in a dispersive environment and there is a large number of cryptic, co-existing native and non-native marine species (e.g. in tunicates; Bock et al. 2012; Perez-Portela et al. 2013). Furthermore, the increasing rate of marine biological invasions on the global scale facilitates numerous secondary contacts between allopatric taxa (Geller et al. 2010).

The recently described *Ciona intestinalis* species complex presents an interesting case to study. The nominal species *C. intestinalis* (Linnaeus, 1767) covers a complex of four cryptic species (Zhan et al. 2010). Two of them, *C. intestinalis* species A and *C. intestinalis* species B (hereafter referred to species A and species B, respectively) are now considered pseudo-cryptic species since the advent of morphological criteria to distinguish them (Sato et al. 2012). In addition, very recently, Brunetti et al. (2015) showed that species A displays morphological features specific to the formerly described Japanese species *Ciona robusta* Hoshino and Tokioka 1967, later synonymized under *C. intestinalis*, whereas species B fits with the *C. intestinalis* description by Millar (1953). These new alpha-taxonomy discoveries have not yet been implemented in the World Register of Marine Species (e.g. *C. robusta* is still a non-accepted name) and we will use 'species A' and 'species B' in the following text. Despite a substantial time elapsed since their divergence (estimated at around 4 Mya; Nydam and Harrison 2011; Roux et al. 2013), the two species are not reproductively isolated: viable and fertile F1 hybrids are easily produced under laboratory conditions (Sato et al. 2014). As in many other tunicates (Shenkar and Swalla 2011), the distribution range of these two species has expanded in the last two centuries due to their accidental introduction via human activities (Zhan et al. 2010). In particular, species A, has been recently introduced (ca. 15-20 years ago; Nydam and Harrison 2011; J.D.D. Bishop, personal communication) in the native European range of species B. Although the two species are widely distributed around the world, the western English Channel and the South of Brittany in the Northeast Atlantic (hereafter referred to as WEC) constitute the only confirmed region in which both species have been reported in sympatry.

Like many other ascidians (Airolidi et al. 2015), the nominal species *C. intestinalis* often forms well-established populations in artificial habitats (e.g. marinas with floating docks, commercial harbors and aquaculture installations). In their area of sympatry — the WEC — species A and species B can also live in syntopy (i.e. in the same locality, Fig. 1). However, because of the cryptic nature of these two species, most published ecological studies do not distinguish between them (Procaccini et al. 2011). Furthermore, *C. intestinalis* spp. is a model organism for evolutionary developmental biology research as well as phylogenetic studies. Nonetheless, ecological data are still lacking with regard to the recent discovery of the cryptic species. Due to its recent introduction in the WEC, species A experiences numerous, unprecedented biotic interactions and environmental changes that may affect its invasion dynamics (Blackburn et al. 2014).

Consequently, there are many issues regarding the history, dynamics and fate of the recent introduction of species A in the native range of species B, including the stability of co-occurrence in species that share the same habitat and localities, the intensity of interspecific competitive interactions, and the occurrence of introgression or a hybrid swarm in sympatry.

To address these issues, we surveyed 11 marinas located along the coasts of Brittany for three years, and examine six distinct generations (i.e. the spring and autumn generations of the same year). We carried out genetic analyses to investigate 1) regional and local variation in the relative abundance of species A and species B; 2) their potential to mate; and 3) the rate and direction of interspecific crosses in the wild.



Figure 1. Artificial plastic substrates are heavily colonized in the study area, including by *Ciona intestinalis* species A (white form) and *C. intestinalis* species B (with yellow rim around siphons) as shown in this picture, which also illustrates the syntopy between the two study species. Photo credit: Wilfried Thomas, Station Biologique of Roscoff.

Material & Methods

Field survey: sampling, morphological species identification and determination of reproductive status

We selected 11 marinas (out of 27) with floating pontoons located along the 1600 km long coastline of Brittany, France. These marinas were representative of a range of characteristics (i.e. open to the sea or closed during low tide (by means of tidal or sill gates)), fully marine or under freshwater (estuarine) influence; see Table S1 for details of each locality). In spring 2012, *Ciona* spp. populations were sampled in 10 marinas over two weeks (Fig. 2a). The same sampling was repeated five times, with an additional site (no. 11 in Fig. 2) in autumn 2012, spring and autumn 2013, and without sites nos. 10 and 11 (see Fig. 2) in spring and autumn 2014. The six sampling dates correspond to at least six different adult generations in European waters (e.g. Dybern 1965; Caputi et al. 2014). In each locality, ca. 200-300 adult individuals (Table 1 for details) were randomly collected along two pontoons during SCUBA diving operations over ca. 50 m.

Additionally, in most of the studied marinas (all except nos. 1, 2, 10 and 11, Fig. 2), seawater temperature was recorded using data loggers (Tidbit®v2) located at 1.5 m depth.

Following their collection, individuals were sedated with phenoxy-2-propanol (1:1000) for 20-30 min to facilitate species identification and excision of tissue samples. Species were identified using morphological criteria according to Sato et al. (2012). For each site, a random subset of 87 specimens ($SD \pm 12.6$; sample size detailed in Table S2) was used to examine the reproductive status (modified from ProtocolJRA1-04.00, <http://www.assemblemarine.org/assets/ASSEMBLE-JRA1-Protocol-04.00mk.pdf>). Given that both species are simultaneous hermaphrodites, although slightly protandrous, three sequential stages of individual development were recorded: immature individuals, presence of sperm only, and presence of sperm and oocytes. A piece of branchial basket was preserved individually in 100% ethanol for further genetic studies.

All statistical analyses were performed using R vers. 3.1.1 (R Development Core Team 2005). To investigate temporal and spatial variations in the relative abundance of both species, a linear mixed-effects model with a binomial error distribution was computed using the *lme4* package (*glmer* function; Bates et al. 2014). Three sites (nos. 6, 10, 11, Fig. 2) with missing data or complete absence of species A were excluded. "Season" (spring and autumn generations) and "Year" (2012, 2013 and 2014) were considered as fixed factors. The factor "Sites" represented pseudo-replicates and was thus categorized as a random factor. In addition, pairwise comparisons among fixed factors were done. Comparisons of the proportion of individuals with sperm, or individuals producing sperm and oocytes, were tested using a Cochran-Mantel-Haenszel (CMH) chi squared test (Mantel 1963) using one contingency table per site, at each sampling date. Only localities with more than 10 individuals for each species were included in these analyses. For pairwise comparisons and CMH chi squared test, *P*-values were adjusted with a Bonferroni correction.

Molecular identification of hybrids

F1 hybrids and introgressed individuals (the two categories being referred to "admixed individuals" in the following text) cannot be discriminated morphologically (Sato et al. 2012). To identify them, species-diagnostic molecular markers were used on a random subset of individuals (average of 60 individuals ± 6.9 (SD) per location and sampling date; Table 2) collected in 2012 and 2013. DNA extraction was performed with Nucleospin® 96 Tissue Kit according to the manufacturer's protocol (Macherey-Nagel, Germany).

Four species-diagnostic markers were used: one mitochondrial marker (mtCOL, cytochrome oxidase I) to identify the maternal lineage, and three nuclear loci, namely vAChTP (vesicular acetylcholine transporter), Cesa (cellulose synthase) and Hox5 (intronic nuclear regions of Hox5 gene) to identify the nuclear background. The Hox5 locus was amplified using the primers and PCR protocol described in Caputi et al. (2007). For this locus, species-diagnostic alleles differ in their length and allele size was scored on simple agarose gels (2%). For mtCOL, vAChTP and Cesa, amplifications (protocols detailed in Nydam and Harrison, 2007, 2010) were followed by enzymatic digestions as explained in Nydam and Harrison (2011).

For each site and sampling date, the proportion of admixed individuals (i.e. displaying at least one alternative species-diagnostic allele) was computed across the four loci. To test for stability of admixture across samples, a Pearson's chi-squared test was used, and *P*-values were calculated using a Monte Carlo simulation with 5000 replicates. To further examine admixture patterns, a hybrid index per maternal lineage was computed for each sampling date using the above-described random subset and additional selected individuals from the field samples to reach a minimum number of 20 individuals per species when possible. The hybrid index was calculated by adding, over the three nuclear loci, the number of alleles specific to species B. It varies from zero to six: zero if each of the three nuclear loci are homozygous for the species A allele and six if the three nuclear loci display only species B alleles.

Table 1. Sample size (N_{tot}), number of individuals unidentified based on morphological criteria (N_{uni}), and percentage of *Ciona intestinalis* species A specimens (based on morphology; % $_{\text{spA}}$), for each study site and sampling date. The overall introgression rate (i.e. proportion of individuals showing an admixed multilocus genotype whatever their maternal lineage; % $_{\text{mix}}$) is indicated for the four surveys for which there were molecular data (i.e. all except in 2014).

	Spring 2012 26 April – 10 May				Autumn 2012 26 Oct. – 6 Nov.				Spring 2013 15 – 25 April				Autumn 2013 14 – 24 Oct.				Spring 2014 15 – 22 May		Autumn 2014 24 – 31 Oct.	
Site	N_{tot}	N_{uni}	% $_{\text{spA}}$	% $_{\text{mix}}$	N_{tot}	N_{uni}	% $_{\text{spA}}$	% $_{\text{mix}}$	N_{tot}	N_{uni}	% $_{\text{spA}}$	% $_{\text{mix}}$	N_{tot}	N_{uni}	% $_{\text{spA}}$	% $_{\text{mix}}$	N_{tot}	% $_{\text{spA}}$	N_{tot}	% $_{\text{spA}}$
1- St Malo	311	1	0.0	0.0	375	1	0.0	0.0	736	1	0.0	0.0	490	1	0.0	1.6	399	0.0	823	1.10
2- St Quay	178	14	5.6	1.6	335	0	33.1	3.3	269	2	3.0	0.0	341	1	12.6	0.0	157	0.6	763	14.2
3- Perros Guirec	297	6	13.5	9.7	305	0	90.2	10.9	223	3	8.5	0.0	531	8	67.0	3.2	217	14.3	495	96.0
4- Trébeurden	228	4	6.6	1.6	262	0	61.1	12.7	436	0	6.7	0.0	474	4	43.2	8.1	281	6.4	809	16.4
5- Roscoff	160	8	8.8	9.7	203	0	2.5	0.0	329	5	0.0	0.0	626	0	0.0	0.0	311	0.0	508	0.0
6- Aber Wrac'h	171	3	0.0	0.0	236	2	0.0	0.0	290	1	0.0	0.0	523	0	0.0	0.0	36	0.0	315	0.0
7- Moulin Blanc	168	1	18.5	1.6	234	1	42.7	13.8	120	1	35.8	7.8	543	1	2.2	1.7	99	0.3	424	3.3
8- Château	205	0	3.4	0.0	721	6	19.1	8.3	300	0	0.0	2.2	778	0	6.0	7.9	295	0.0	906	8.0
9- Camaret-sur-Mer	260	4	6.5	0.0	306	1	30.4	10.0	214	2	5.1	0.0	543	4	20.3	9.4	236	4.7	463	38.2
10- Concarneau	338	1	1.5	0.0	474	1	60.1	9.7	264	0	0.0	0.0	712	0	27.2	3.2	-	-	-	-
11- Quiberon	-	-	-	-	227	1	8.4	0.0	367	1	0.5	0.0	360	0	3.6	3.2	-	-	-	-
Mean	232	4.2	6.4	2.4	334	1.2	33.9	6.2	323	1.5	5.9	0.9	538	1.7	17.9	3.5	226	2.9	612	19.7
Standard deviation	66	4.3	5.9	3.9	150	1.7	29.6	5.6	160	1.5	10.5	2.4	131	2.6	21.7	3.5	113	4.9	213	31.1
Total	2316	42	6.0	2.0	3678	13	32.2	6.3	3548	16	3.1	0.8	5921	19	16.6	3.5	2031	3.1	5506	22.0

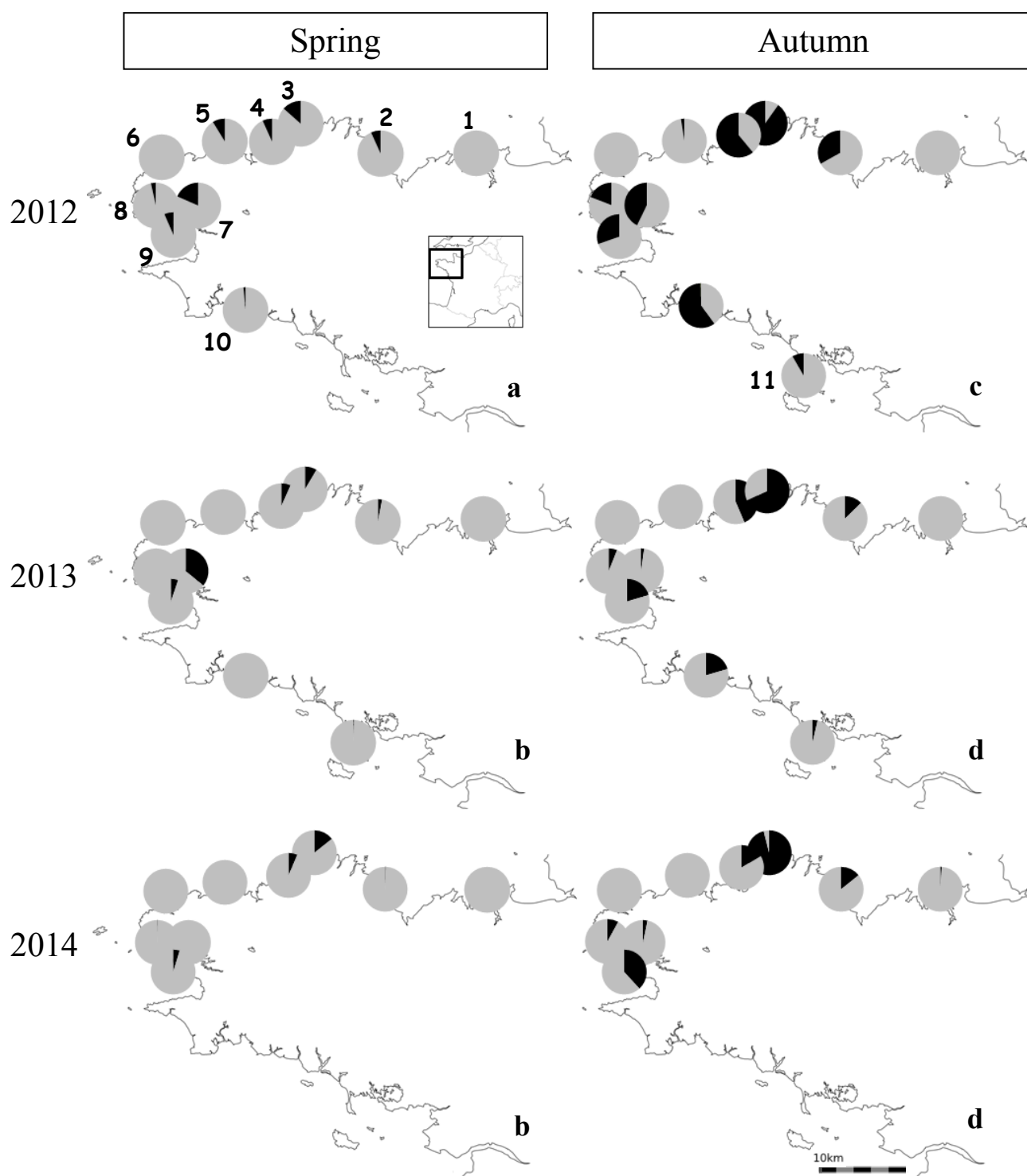


Figure 2. Relative abundance of *Ciona intestinalis* species A (in black) and species B (in gray) in the 11 study sites (1: St Malo, 2: St Quay, 3: Perros Guirec, 4: Trébeurden, 5: Roscoff, 6: Aber Wrac'h, 7: Moulin Blanc, 8: Château, 9: Camaret-sur-Mer, 10: Concarneau, 11: Quiberon) from spring 2012 to autumn 2014. Maps with the same letter indicate non-significant differences between sampling dates (pairwise comparisons, $P > 0.05$).

Table 2. Proportion of admixed individuals, i.e. individuals showing a mixture of alleles diagnostic for *Ciona intestinalis* species A and *C. intestinalis* species B, for each maternal lineage separately (%mix spA and %mix spB for individuals diagnosed with species A mitochondria and a species B mitochondria, respectively), for each site and sampling date studied in 2012 and 2013. N_{spA} and N_{spB} are the number of specimens for which admixture was examined.

	Spring 2012				Autumn 2012				Spring 2013				Autumn 2013			
Site	N _{spA}	%mix spA	N _{spB}	%mix spB	N _{spA}	%mix spA	N _{spB}	%mix spB	N _{spA}	%mix spA	N _{spB}	%mix spB	N _{spA}	%mix spA	N _{spB}	%mix spB
1- St Malo	0	-	56	0.0	0	-	62	0.0	0	-	60	0.0	0	-	64	1.6
2- St Quay	5	20.0	58	0.0	28	7.1	33	0.0	2	0.0	55	0.0	19	0.0	44	0.0
3- Perros Guirec	18	33.3	44	0.0	56	12.5	8	0.0	4	0.0	44	0.0	50	4.0	12	0.0
4- Trébeurden	4	25.0	59	0.0	40	15.0	23	8.7	5	0.0	54	0.0	29	10.3	33	6.1
5- Roscoff	5	40.0	26	3.8	1	0.0	57	0.0	0	-	77	0.0	0	-	60	0.0
6- Aber Wrac'h	0	-	62	0.0	0	-	58	0.0	0	-	63	0.0	0	-	62	0.0
7- Moulin Blanc	11	9.1	51	0.0	33	18.2	25	8.0	19	21.1	32	0.0	3	33.3	56	0.0
8- Château	0	-	64	0.0	23	21.7	37	0.0	0	-	46	2.2	6	16.7	57	7.0
9- Camaret-sur-Mer	8	0.0	56	0.0	28	17.9	32	3.1	3	0.0	46	0.0	17	29.4	47	2.1
10- Concarneau	1	0.0	63	0.0	48	12.5	14	0.0	0	-	60	0.0	20	5.0	42	2.4
11- Quiberon	-	-	-	-	5	0.0	59	0.0	0	-	55	0.0	5	40.0	56	0.0
Mean	5.2	18.2	53.9	0.4	23.8	11.7	37.1	1.8	3.0	4.2	53.8	0.2	13.6	17.3	48.5	1.7
Standard deviation	5.8	15.8	11.5	1.2	20.0	7.8	19.2	3.4	5.6	9.4	11.8	0.7	15.6	15.1	15.4	2.6

Laboratory crosses

Although the two species have been previously shown to be interfertile (e.g. Suzuki et al. 2005; Caputi et al. 2007; Sato et al. 2014), we carried out additional fertilization tests to ascertain that F1 hybrids could be easily produced with individuals from our study area. A series of biparental crosses (47 conspecific, 38 heterospecific and 23 self-crosses) were carried out using individuals sampled in autumn 2013 in the marinas of Aber Wrac'h (species B) and Moulin Blanc (species A and species B) (site nos. 6 and 7 in Fig. 2, respectively) following protocols available in Cirino et al. (2002) and Sato et al. (2014). Fertilization success was estimated by computing the proportion of eggs with cellular division after 1 h (i.e. fertilization rate). Following Sato et al. (2014), a linear mixed-effects model and pairwise comparisons were used to investigate differences in fertilization rate according to the type of cross (i.e. six categories: two heterospecific (with reverse parental roles for each species), two conspecific and two self-crosses) as a fixed factor. Because the same individuals were used in different crosses, a random effect of male genotype nested by female genotype was added.

Results

Significant variation in the relative abundance of the two species across generations

In the first study generation (i.e. spring 2012), species A and species B co-occurred in 8 localities out of the 10 surveyed, although species A was never abundant (Fig. 2). Detailed values per site and sampling date are given in Table 1. Although abundance varied across localities, regionally 6.0% of the 2,316 individuals were morphologically identified as species A in spring 2012. This spatial pattern changed dramatically in autumn 2012 with 32.2% of the individuals identified as species A out of the 3,678 individuals collected in 11 marinas (Fig. 2). Similar patterns were observed in 2013 and 2014 with an increase in the relative abundance of species A in autumn (Table 1, Fig. 2).

At the locality level, 7 of the 11 studied marinas showed temporal variation similar to the regional pattern, with some showing particularly strong contrasts between spring and autumn generations (e.g. Perros Guirec; no. 3 in Fig. 2). The remaining four localities showed distinct features. Moulin Blanc (no. 7, Fig. 2) showed a different pattern in 2013, with spring abundance of species A (35.8%) being much higher than in autumn (2.2%). In Roscoff (no. 5, Fig. 2), a regular decrease in species A was observed over the course of the survey, starting in spring 2012 with 8.8% of species A dropping to 0% during the last four sampling dates. Conversely, the presence of species A was first recorded in St Malo (no. 1, Fig. 2) during the last sampling date (autumn 2014; 1.1% of species A). Finally, species A was absent in one site (Aber Wrac'h, no. 6 in Fig. 2) on all sampling dates.

Altogether, a significant interaction was found between season and year (Table 3a) which reflects 1) an increase in the relative abundance of species A in autumn compared with spring of the same year and 2) a higher relative abundance of species A in 2012 compared with the following two years (Fig. 2).

Synchronous gamete production and successful fertilization between the two species

The reproductive status of individuals at each sampling date for both study species is illustrated with ternary diagrams (Fig. 3): the distribution of the three categories varied among species and localities. When comparing species for the proportion of individuals with sperm only, there were significant differences in spring and autumn 2013 ($P < 0.001$ and $P < 0.001$, respectively) and in autumn 2014 ($P = 0.032$). The proportion of individuals with both types of gametes showed a similar pattern with no significant difference except for two dates (in autumn 2012 and autumn 2014; $P < 0.001$). Altogether, regardless of the species, a high proportion of individuals produced gametes on all sampling dates. For example, in Trébeurden (no. 4, Fig. 2) in spring 2012, 100% of

species A individuals and 84% of species B individuals showed both sperm and oocytes. Detailed values per site and sampling date are provided in Table S2.

There were significant differences in fertilization rates when comparing cross type (Fig. 4, Table 3b). In particular, selfing success was very poor. Fertilization rates of heterospecific crosses with oocytes from species B did not differ from those of the two conspecific crosses (ca. 80%, Fig. 4). Fertilization rates dropped to very low values (<6%) when species A was the female parent (Fig. 4).

Table 3. Results of linear mixed models testing a) the effects of season and sampling year on the relative abundance of *Ciona intestinalis* species A and *C. intestinalis* species B in syntopic localities and b) the effect of cross type on the fertilization rate. Degrees of freedom (d.f.), residual d.f., residual deviation and *P*-value (from Chi-squared test) are given. Significant *P*-values are shown in italics.

Variable	Model	d.f.	Residual d.f.	Residual deviation	<i>P</i> -value
a) Relative species abundance	Null model		46	2968.1	
	Year	2	44	2804.9	<0.01
	Season	1	45	1667.9	<0.001
	Year x Season	5	41	1319.2	< 0.001
b) Fertilization rate	Null model		105	720.85	
	Cross type	5	100	203.44	<0.001

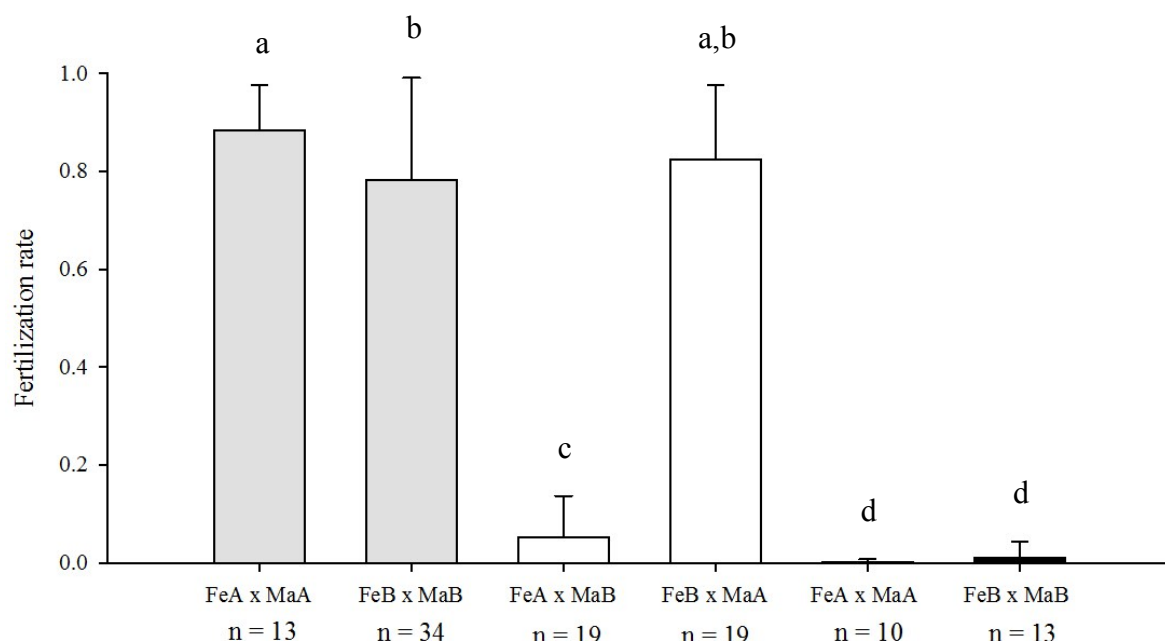


Figure 4. Fertilization rate for conspecific crosses (i.e. using female (Fe) and male (Ma) gametes of the same species, gray bars), heterospecific crosses (i.e. using female and male gametes from different species, white bars) and self-crosses (i.e. using gametes from the same individual, black bars). Values with the same letter are not significantly different (pairwise comparisons, $P > 0.05$).

mtDNA-based species identification

Altogether, 3,048 individuals collected during the four surveys carried out in 2012 and 2013 were genotyped over four loci including one mitochondrial marker for identifying the maternal lineage. Only 33 of them (1.08%) showed discordance between morphological and mitochondrial identification, indicating a close association between maternal type and species assignment based on morphology. During the 2012 and 2013 field surveys, 90 individuals out of 15,463 (0.59%) were morphologically recorded as “unidentified” (Table 1); most (82%) of these showed a species B maternal lineage.

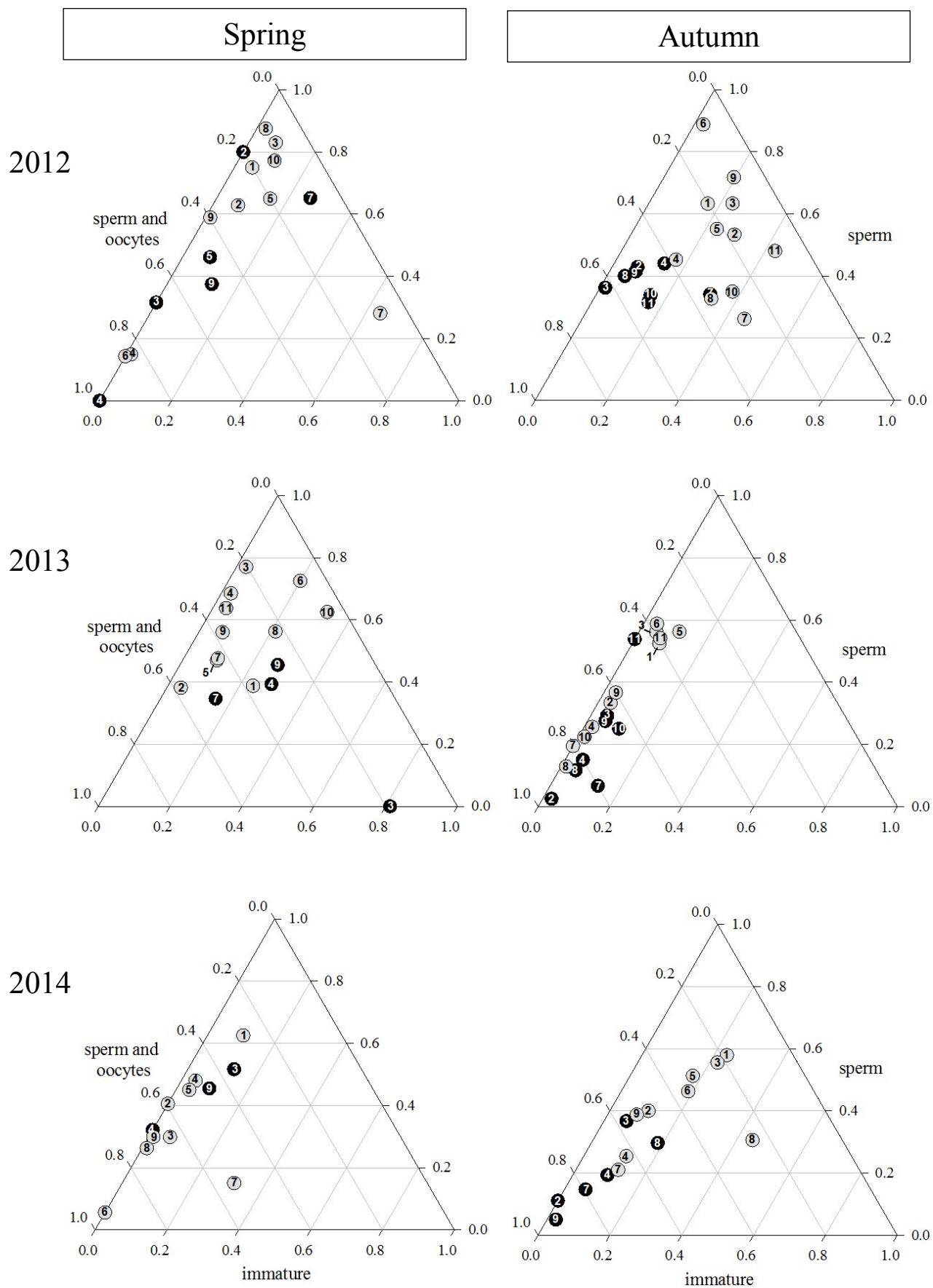


Figure 3. Ternary diagrams representing the proportion of the three recorded reproductive stages for *Ciona intestinalis* species A (black circles) and for species B (gray circles), for each sampling date. Numbers in the circles refer to site numbers (see Table 1).

A unique putative F1 hybrid and little genetic admixture in the wild

Only 131 of the 3,048 individuals (4.3%) showed an admixed genome and all of them displayed very low hybrid index values (Fig. 5). In addition, only one (0.03%) individual was possibly a first-generation hybrid (i.e. heterozygote across the three nuclear loci). This putative F1 hybrid displayed a species B maternal lineage and was found in Perros Guirec (no. 3, Fig. 2) in autumn 2013.

Regardless of maternal type, at the regional level, the proportion of admixture varied from 0.8% (spring 2013) to 6.3% (autumn 2012). A slightly higher rate of admixture was found in the autumn generations compared with the spring generations (Table 1). The admixture rate varied slightly across localities (Table 1). In particular, in localities where the two species co-occurred, admixed individuals were frequently found. For instance during the first sampling date 1.6% in St Quay, Trébeurden and Moulin Blanc (nos. 2, 4 and 7, Fig. 2) and 9.7% in Perros Guirec and Roscoff (nos. 3 and 5, Fig. 2). In contrast, no admixed individuals were observed in the locality where species A was absent throughout the survey (Aber Wrac'h, no. 6 in Fig. 2). These variations are, however, explained by differences in admixture patterns between individuals with different maternal backgrounds (Table 2). Large differences in the admixture proportion were indeed observed between the two groups with 82.4% of the 131 of individuals showing an admixed genome characterized by a species A maternal lineage. In addition, the admixture proportion of individuals with a species A maternal lineage was stable across localities and time (all localities and sampling date comparison, $P=0.178$) and across localities at each sampling date separately ($P>0.05$ except in autumn 2013: $P=0.032$). In contrast, the proportion of admixed individuals with a species B maternal lineage was variable across localities and time (all localities and sampling date comparisons, $P=0.002$) and across localities for each sampling date ($P<0.05$ except in spring 2013: $P=0.129$). Altogether, these results show that most of the variation in admixture among localities or sampling dates (Table 1) is due to variation in the relative abundance of species A, which showed the highest admixture rate.

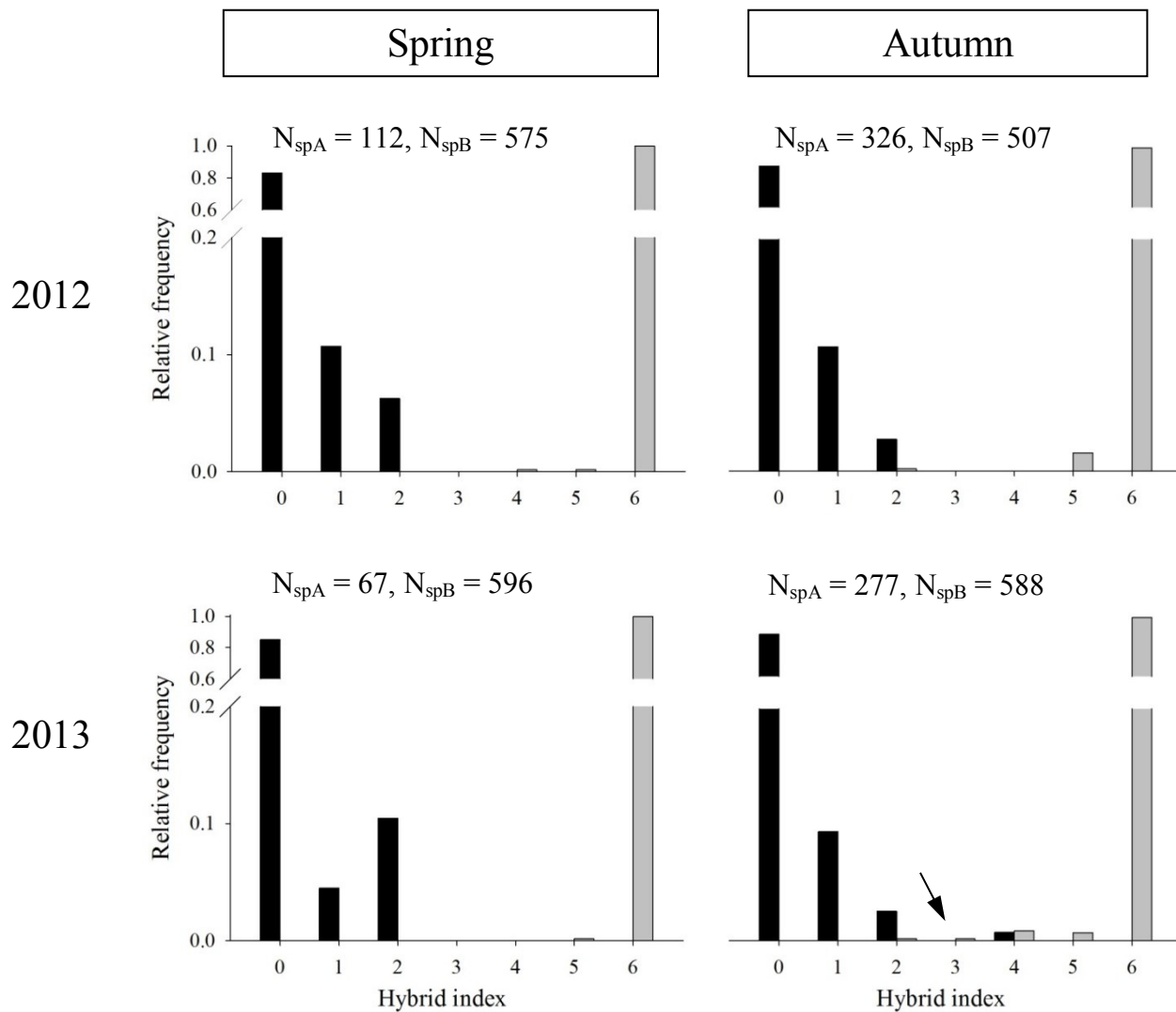


Figure 5. Hybrid index computed for each sampling date for individuals with a *Ciona intestinalis* species A (black bars) and *C. intestinalis* species B (gray bars) maternal lineage. Maternal lineage was ascertained with a diagnostic mitochondrial marker (see text). N_{spA} and N_{spB} are the number of specimens examined. The individual (sampled in autumn 2013) indicated by an arrow has a hybrid index of 3 and is the only putative F1 hybrid found of the 3,048 study individuals.

Discussion

The non-native tunicate *Ciona intestinalis* species A is well established

Based on the morphological examination of 23,000 individuals covering six different generations, we documented the durable establishment of the non-native species (NNS) *C. intestinalis* species A along the coasts of Brittany, ca. 15-20 years after the first reports of its introduction in the WEC. The first detailed study on the co-occurrence of species A and species B in the English Channel (Nydam and Harrison 2011) revealed no samples of species A specimens during a follow-up survey (in 2009, two years after their first survey), interpreted as a possible decline of the NNS in the localities surveyed. This decline was not confirmed in our study. Our data, combined with those of Nydam and Harrison (2011), illustrate the importance of temporal monitoring over a substantial time window, particularly during the establishment stage, as well as during different seasons for short-lived species.

Despite the sustainable regional establishment of species A, there was local population instability: for instance, the Roscoff marina showed a steady decline leading to complete disappearance. Local population dynamics are likely to be unstable in this short-lived and recently introduced NNS, as observed in other introduced regions (e.g. Saldanha Bay in South Africa, Rius et al. 2011). Such major changes in site occupancy and local abundance in just a few years have already been documented in other NNS discovered in the English Channel (e.g. Bishop et al. 2014). Many environmental and biotic mechanisms influence the successful and durable establishment of NNS (Blackburn et al. 2014), including competitive interactions which may exacerbate invasion dynamics (Simberloff and Stiling 1996; Alpert 2006). This mechanism may be particularly important here because the non-native species A co-occurs with its congener (Fig. 1).

Seasonal variation in species abundance: the outcome of competition in a changing environment

Regular field work, sampling and monitoring as well as panels experiments examining settlement dynamics of *Ciona* sp. (S. Bouchemousse, L. Lévêque, F. Viard, unpublished data) showed that spring and autumn generations are two separate generations, for the two study species. This is in agreement with the few data documenting the number of generations per year in the study area (Dybern 1965 in the North Atlantic for species B). By examining these two distinct generations of the same year, during three years, we documented a significant increase in the relative abundance of species A in autumn. Adults sampled in autumn likely correspond to juveniles that had settled from spring to early summer, when sea water temperatures increase from ca. 12  C in April to ca. 18  C in August-September in the study area (Figure S1). Conversely, adults sampled in spring likely correspond to juveniles that have settled in late summer / early fall, and which survive across the winter season (S. Bouchemousse, L. Lévêque, F. Viard, unpublished data). Seawater temperature greatly influences the development, growth and survival of *Ciona intestinalis* spp. (Dybern 1965; Marin et al. 1987), with species A and species B reported as warm-water and cold-water species, respectively (Procaccini et al. 2011; Caputi et al. 2014). We observed higher growth rates at 17  C, for species A than species B during laboratory experiments (data not shown), confirming previous findings (Petersen et al. 1995) based on the growth rate of the nominal species *C. intestinalis* in localities where only species A or species B are now reported (e.g. at 15  C, growth rate varies between 2 and 3% in length per day for Japanese populations (species A) and between 0.7 and 1.1% per day for individuals from Scotland (species B)). In the study area, temperatures above 15  C are only observed from June to October (Figure S1). It is also noteworthy that in the localities with the lowest maximum values of sea water temperatures (i.e. Aber Wrac'h and Roscoff, with a maximum always below 17  C) *C. intestinalis* species A has never been observed or declined up to disappearance. The observed seasonal variations may thus partly result from spatial competition among species A and B. The autumn generation of species A may have a competitive advantage, due to its faster growth rate during the warmer season.

Although temperature is likely the main environmental driver of the seasonal dynamics of the two congeners at a regional scale, other factors can drive local population dynamics. In particular, episodes of low salinity, due to rainfall and river inputs, can decrease survival of *C. intestinalis* (Lambert and Lambert 1998). Such perturbation events due to abrupt variations in environmental parameters have been recorded in our study area, as illustrated in Figure S2 for the marina of Moulin Blanc (no. 7 in Fig. 2), where additional monitoring (independent of our study; L. Lévêque, unpublished data) for *C. intestinalis* spp. abundance and salinity was carried out in 2013-2014. Salinity declined sharply and subsequently *Ciona* spp. died off massively during winter months from January to March 2014. Synergistic effects between temperature and salinity may explain the very high percentage of species A observed in some localities such as Perros-Guirec (up to 90%; Fig. 2): this marina is closed off from the sea at low tide and remains several days without seawater renewal during neap tides such that 1) salinity can rapidly decrease in winter (due to rainfall) and 2) temperature can increase on the surface in summer (Figure S1). After winter die-offs of both species, due both to low temperatures and low salinity episodes, increasing seawater temperature may favor a more rapid colonization of species A over species B, taking

into account its faster growth rate, on pontoons from adjacent sources (e.g. pillars, sea-wall), giving locally and at some particular season, a competitive advantage to species A over species B. Conversely, Roscoff is an open, fully marine marina in the coldest part of the Brittany coastline (i.e. 13°C annual average, Gallon et al. 2014). No massive mortality of *Ciona intestinalis* spp. has ever been observed and low temperatures may favor the development of species B, leading to competitive exclusion of species A.

Altogether, our study suggests that, with a few exceptions, environmental conditions in the study sites meet the niche requirements of the NNS species, though local variations in environmental parameters may favor one or the other of the two species, and thus may influence the outcome of competitive interactions among them. In particular, species A, thanks to its faster growth rate, may have a better adaptive potential than species B for (re)colonizing substrates during warmer seasons after disturbances due to variations in environmental factors, like a sharp decline in salinity after rains. Over larger temporal scales, the predicted increase of sea surface temperature (i.e. 0.35°C per decade; Gallon et al. 2014) and winter rainfalls (Ouzeau et al. 2014) in Brittany, due to climate change, could promote a substantial increase of the relative abundance of the NNS compared with its native congener in its introduced range.

Efficient barriers prevent hybridization in the wild

Sexually mature, gamete-producing individuals occurred simultaneously in the two study species which are interfertile and live in syntopy in most of the study localities. Despite these features that are expected to favor hybridization, the admixture rate was very low (4.3%) and only one putative F1 hybrid was observed in this study on more than 3,000 individuals, confirming previous studies (4.2% in localities of the WEC, Nydam and Harrison 2011; 6.3% in one British locality, Sato et al. 2014). Ecological and/or genetic barriers thus seem to be at play and limit hybridization between the two species in the wild in Brittany. The success of interspecific fertilization in laboratory conditions (Fig. 4) seemingly suggests that post-zygotic isolation mechanisms act in the wild through a reduction in hybrid fitness (Abbott et al. 2013). However, Sato et al. (2014) showed that F1 hybrids are viable and produce functional gametes, suggesting that hybrid depression, if any, is expressed at an earlier stage (e.g. larvae or juveniles). However, preliminary findings from a molecular study of juveniles of species A and species B in four marinas of the WEC (nos. 4, 5, 7 and 8; Fig. 2) showed rates of admixture similar to those observed in adults (S. Bouchemousse, L. Lévêque, F. Viard, unpublished data). Pre-zygotic isolation mechanisms can enhance assortative mating; however, given the close contact (see Fig. 1), habitat segregation and behavior cannot be efficient reproductive isolation mechanisms. Differences in the timing of reproductive development, as suggested by Sato et al. (2014), are also unlikely because we observed a high proportion of individuals producing gametes in both species and each sampling date. Gamete release occurs over several days or even weeks (Carver et al. 2003), invalidating any consideration of slight shifts in the timing of gamete release in light of the short survival time of the gametes in seawater (i.e. 16 h after release for sperm and 30 h for oocytes; Svane and Havenhand 1993). Assortative fertilization, facilitated by species-specific chemical attraction, can be a key mechanism for reproduction in broadcast-spawning marine invertebrates in marine systems (Palumbi 1994). This mechanism has been described already within species complexes, for instance in two tropical sea urchins of the *Echinometra* species complex (Geyer and Palumbi 2005) and in two mussels of the *Mytilus* species complex (Bierne et al. 2002). Laboratory gamete choice experiments are needed to investigate this mechanism in the *C. intestinalis* species complex.

The source of admixture: historical or contemporary processes?

In the laboratory, F1 hybrids are easily obtained in one direction only, i.e. with species B oocytes (Fig. 4). Asymmetrical interspecific fertilization success is common, including in free-spawning marine invertebrates (e.g. Rawson et al. 2003; Geyer and Palumbi 2005). The direction of this asymmetry was however unexpected based on the observed admixture rates that we

computed according to the maternal lineage (82.4% of the 131 admixed individuals showed a species A maternal lineage). There are two possible explanations of this discrepancy between laboratory and field data. First, the few offspring produced by the least productive heterospecific crosses (i.e. a species A female crossed with a species B male) may be particularly fertile and vigorous. Similar situations with successful hybrids produced by parental combinations with low fertilization success have already been described, even in marine systems (e.g. Blum et al. 2010). This process may foster adaptive introgression of the NNS (species A) and/or drive hybrids to replace parental species (e.g. Rosenfield et al. 2004; Schierenbeck and Ellstrand 2009). Second, conditions that promote successful crosses in the laboratory may not be the conditions found in the wild (Sato et al. 2014). Monitoring survival of hybrid offspring obtained from experimental crosses is one way to test these two hypotheses. It is also interesting to note that the direction of the asymmetry is variable across studies: the direction observed here is in agreement with what has been reported by Caputi et al. (2007) but not with Sato et al. (2014), although in both studies some of the crosses involved individuals from the North Atlantic. Factors promoting (preventing) the hybridization success are potentially numerous, and among them the origin and the genetic background, in particular the introgression profiles (see below), may be important factors to consider in future studies.

Alternatively, from a conceptually different viewpoint, observed admixture may reflect the footprint of a previous secondary contact between species A and species B (Roux et al. 2013). Roux et al. (2013) compared various speciation models (e.g. divergence models with or without interspecific gene flow) using Approximate Bayesian Computations based on full transcriptomes of species A and species B (10 individuals for each). The best model to explain the data was a model of divergence with gene flow resulting from a secondary contact between the two species after their primary divergence (4 Mya ago). During this secondary contact, ca. 20% of loci presumably crossed the species barrier in both directions (Roux et al. 2013). The authors then estimated the age of this secondary contact between 4,300 and 56,800 years ago. Many secondary contacts have been documented in marine systems during this period which corresponds to the end of the Pleistocene (Maggs et al. 2008; Geller et al. 2010). The number of studies showing interspecific gene flow following these secondary contacts also recently increased (Abbott et al. 2013, see Becquet et al 2012 for an example). In this context, past hybridization is very plausible explanation of our results because it can account for 1) the discrepancy observed between laboratory and field experiments; 2) the temporal and spatial stability of the proportion of admixed individuals for species A; and 3) the complex evolutionary history of the two study cryptic species (Roux et al. 2013). Although historical processes may explain most of the admixture observed, contemporary interspecific gene flow remains possible based on our results in two localities: in St Malo, no admixed individuals were observed until autumn 2013 following the colonization of this locality by species A and in Roscoff, admixed individuals were observed in 2012, but none afterwards when species A disappeared. Finally, at Aber Wrac'h, the only locality where no species A specimens were ever observed, did not show any admixed specimens. Furthermore — and interestingly — in St Malo and Aber Wrac'h, all admixed individuals displayed a species B maternal lineage, as did the only putative F1 hybrid found in our study (in Perros Guirec).

Altogether, our results suggest that past secondary contacts influenced the introgression rates measured here and rare contemporary hybridizations in the wild account mainly for the admixed individuals with a species B maternal background, in agreement with laboratory assays. The status of the presumed species diagnostic markers used so far (Caputi et al. 2007; Nydam and Harrison 2011; Sato et al. 2014; this study) need to be re-evaluated because the three loci behave differently: *CesA* and *vAChTP* highlight admixture in species B maternal backgrounds whereas *Hox5* revealed admixture with species A maternal backgrounds (see Table S3). Although not discernable in our laboratory crosses (or in the literature, Caputi et al. 2007), we suggest that *Hox5* crossed the species barrier a long time ago, in contrast to the two other loci (similar to the *Glu* locus which was mistakenly considered as a diagnostic marker of *Mytilus* species, Borsa et al. 2012). High-throughput genotyping based on SNPs are currently in progress to better investigate

the fate of the introgression hot-spots defined by Roux et al. (2013) and the true extent of contemporary hybridization in wild *Ciona* populations.

In conclusion, our study highlights the importance of temporal monitoring adapted to the life cycle and the generation time of short-lived NNS. This type of monitoring is critical for early-warning and accurate assessments of the durable establishment of introduced species. Our results also illustrate how difficult it is to predict the outcome of human-mediated introductions, even in supposedly well-known model species: we expected to find a large proportion of hybrids and introgression events between species A and species B, but only rare events (if any) were uncovered despite extensive sampling. Our results pave the way for future research on the reproductive isolation mechanisms acting in the wild between these model organisms, as well as on the processes that can sustain long-term co-occurrence of two functionally similar and congeneric species living in syntopy.

Acknowledgment

We are very grateful to the divers of the Marine Operations department (*Service Mer & Observation*) at the Roscoff Biological Station for help in the field and to M. Danielo for assistance in data acquisition. FV thanks M. Nydam for her recommendations regarding molecular protocols. We are thankful for the numerous marina operators who provided access to pontoons and permission to carry out this study. We acknowledge S. Le Cam and T. Broquet for advices regarding statistical analyses, N. Bierne for stimulating discussions about hybridization and introgression processes, and C. Lejeusne and T. Comtet for comments on earlier versions of this manuscript. This work was supported by the Interreg IVa Marinexus program and the ANR project HYSEA (no. ANR-12-BSV7-0011).

References

- Abbott RJ (1992) Plant invasion, interspecific hybridization and the evolution of new plant taxa. *Trends Ecol Evol* 7:401-405.
- Abbott R, Albach D, Ansell S et al (2013) Hybridization and speciation. *J Evol Biol* 26:229-246.
- Airoldi L, Turon X, Perkol-Finkel S et al (2015) Corridors for aliens but not for natives: effects of marine urban sprawl at a regional scale. *Divers Distrib* doi: 10.1111/ddi.12301
- Allendorf FW, Leary RF, Spruell P et al (2001) The problems with hybrids: setting conservation guidelines. *Trends Ecol Evol* 16:613-622.
- Alpert P (2006) The advantages and disadvantages of being introduced. *Biol Invasions* 8:1523-1534.
- Bates D, Maechler M, Bolker B et al (2014) lme4: Linear mixed-effects models using Eigen and S4. R package version 1.1-7 <http://CRAN.R-project.org/package=lme4>.
- Becquet V, Simon-Bouhet B, Pante E et al (2012) Glacial refugium versus range limit: Conservation genetics of *Macoma Balthica*, a key species in the Bay of Biscay (France). *J Exp Mar Biol Ecol* 432-433:73-82.
- Bierne N, David P, Boudry P et al (2002) Assortative fertilization and selection at larval stage in the mussels *Mytilus edulis* and *M. galloprovincialis*. *Evolution* 56:292-298.
- Bishop JDD, Wood CA, Lévêque L et al (2014) Repeated rapid assessment surveys reveal contrasting trends in occupancy of marinas by non-indigenous species on opposite sides of the western English Channel. *Mar Pollut Bull*, doi:10.1016/j.marpolbul.2014.11.043.
- Blackburn TM, Essl F, Evans T et al (2014) A unified classification of alien species based on the magnitude of their environmental impacts. *PLoS Biol* 12, doi:10.1371/journal.pbio.1001850
- Blum MJ, Walters DM, Burkhead NM et al (2010) Reproductive isolation and the expansion of an invasive hybrid swarm. *Biol Invasions* 12:2825-2836.
- Bock DG, MacIsaac HJ, Cristescu ME (2012) Multilocus genetic analyses differentiate between widespread and spatially restricted cryptic species in a model ascidian. *Proc R Soc B* 279:2377-2385.
- Borsa P, Rolland V, Daguin C (2012) Genetics and taxonomy of Chilean smooth-shelled mussels, *Mytilus* spp. (Bivalvia: Mytilidae). *C R Biol* 335:51-61.
- Brunetti R, Gissi C, Pennati R et al (2015) Morphological evidence that the molecularly determined *Ciona intestinalis* type A and type B are different species: *Ciona robusta* and *Ciona intestinalis*. *J Zoolog Syst Evol Res*, doi: 10.1111/jzs.12101
- Caputi L, Andreakis N, Mastrototaro F et al (2007) Cryptic speciation in a model invertebrate chordate. *Proc Natl Acad Sci USA* 104:9364-9369.
- Caputi L, Crocetta F, Toscano F et al (2014) Long-term demographic and reproductive trends in *Ciona intestinalis* sp. A. *Mar Ecol* 36:118-128.
- Carver CE, Chisholm A, Mallet AL (2003) Strategies to mitigate the impact of *Ciona intestinalis* (L.) biofouling on shellfish production. *J Shellfish Res* 22:621-631.
- Cirino P, Toscano F, Caramiello D et al (2002) Laboratory culture of the ascidian *Ciona intestinalis* (L.): a model system for molecular developmental biology research. *Marine Models Electronic Record*. Available from <http://www.mbl.edu/html/BB/MMER/CIR/CirTit.html>
- Coleman RR, Gaither MR, Kimokeo B et al (2014) Large-scale introduction of the Indo-Pacific damselfish *Abudefduf vaigiensis* into Hawai'i promotes genetic swamping of the endemic congener *A. abdominalis*. *Mol Ecol* 23:5552-5565.
- Currat M, Ruedi M, Petit RJ et al (2008) The hidden side of invasions: Massive introgression by local genes. *Evolution* 62:1908-1920.
- Dybern BI (1965) The life cycle of *Ciona intestinalis* (L.) f. *typica* in relation to the environmental temperature. *Oikos* 16:109-131.
- Fitzpatrick BM, Johnson JR, Kump DK et al (2010) Rapid spread of invasive genes into a threatened native species. *Proc Natl Acad Sci USA* 107:3606-3610.

- Gallon RK, Robuchon M, Leroy B et al (2014) Twenty years of observed and predicted changes in subtidal red seaweed assemblages along a biogeographical transition zone: inferring potential causes from environmental data. *J Biogeogr* 41:2293-2306.
- Geller JB, Darling JA, Carlton JT (2010) Genetic perspectives on marine biological invasions. *Annu Rev Mar Sci* 2:367-393.
- Geyer LB, Palumbi SR (2005) Conspecific sperm precedence in two species of tropical sea urchins. *Evolution* 59:97-105.
- Guo Q (2014) Plant hybridization: the role of human disturbance and biological invasion. *Divers Distrib* 20:1345-1354.
- Harrison RG (2012) The language of speciation. *Evolution* 66:3643-3657.
- Lambert CC, Lambert G (1998) Non-indigenous ascidians in southern California harbors and marinas. *Mar Biol* 130:675-688.
- Maggs CA, Castilho R, Foltz D et al (2008) Evaluating signatures of glacial refugia for North Atlantic benthic marine taxa. *Ecology* 89:S108-S122.
- Mantel N (1963) Chi-square tests with one degree of freedom: Extensions of the Mantel-Haenszel Procedure. *J Am Statist Assoc* 58:690-700.
- Marin MG, Bressan M, Beghi L et al (1987) Thermo-haline tolerance of *Ciona intestinalis* (L., 1767) at different developmental stages. *Cah Biol Mar* 28:47-57.
- Millar RH (1953) *Ciona*. In: Colman JS (ed.) *L.M.B.C. Memoirs of Typical British Marine Plants and Animals*, XXV. Liverpool University Press, Liverpool, pp 123.
- Molnar JL, Gamboa RL, Revenga C et al (2008) Assessing the global threat of invasive species to marine biodiversity. *Front Ecol Environ* 6:485-492.
- Nydam ML, Harrison RG (2007) Genealogical relationships within and among shallow-water *Ciona* species (Ascidacea). *Mar Biol* 151:1839-1847
- Nydam ML, Harrison RG (2010) Polymorphism and divergence within the ascidian genus *Ciona*. *Mol Phylogenet Evol* 56:718-726.
- Nydam ML, Harrison RG (2011) Introgression despite substantial divergence in a broadcast spawning marine invertebrate. *Evolution* 65:429-442.
- Ouzeau G, Déqué M, Jouini M et al (2014) Scénarios régionalisés - édition 2014 - pour la métropole et les régions d'outre-mer. In : Jouzel J (ed) *Le climat de la France au XXI^e siècle*. Direction Générale de l'Energie et du Climat 4: 62.
- Palumbi SR (1994) Genetic divergence, Reproductive isolation and marine speciation. *Annu Rev Ecol Syst* 25:547-572.
- Perez-Portela R, Arranz V, Rius M et al (2013) Cryptic speciation or global spread? The case of a cosmopolitan marine invertebrate with limited dispersal capabilities. *Sci Rep* 3, doi:10.1038/srep03197.
- Petersen JK, Schou O, Thor P (1995) Growth and energetics in the ascidian *Ciona intestinalis*. *Mar Ecol Prog Ser* 120:175-184.
- Procaccini G, Affinito O, Toscano F et al (2011) A new animal model for merging Ecology and Evolution. In: Pontarotti P (ed) *Evolutionary Biology: concepts, biodiversity, macroevolution and genome evolution*. Springer-Verlag, Berlin, pp 91-106
- R Development Core Team (2005) *R: A language and environment for statistical computing*. R Foundation for Statistical, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL: <http://www.R-project.org>.
- Rawson PD, Slaughter C, Yund, PO (2003) Patterns of gamete incompatibility between the blue mussels *Mytilus edulis* and *M. trossulus*. *Mar Biol* 143:317-325.
- Rhymer JM, Simberloff D (1996) Extinction by hybridization and introgression. *Annu Rev Ecol Syst* 27:83-109.
- Rius M, Heasman KG, McQuaid CD (2011) Long-term coexistence of non-indigenous species in aquaculture facilities. *Mar Pollut Bull* 62:2395-2403.
- Rosenfield JA, Nolasco S, Lindauer S et al (2004) The role of hybrid vigor in the replacement of Pecos pupfish by its hybrids with sheepshead minnow. *Conserv Biol*, 18 1589-1598.
- Roux C, Tsagkogeorga G, Bierne N et al (2013) Crossing the species barrier: genomic hotspots of introgression between two highly divergent *Ciona intestinalis* species. *Mol Biol Evol* 30:1574-1587.

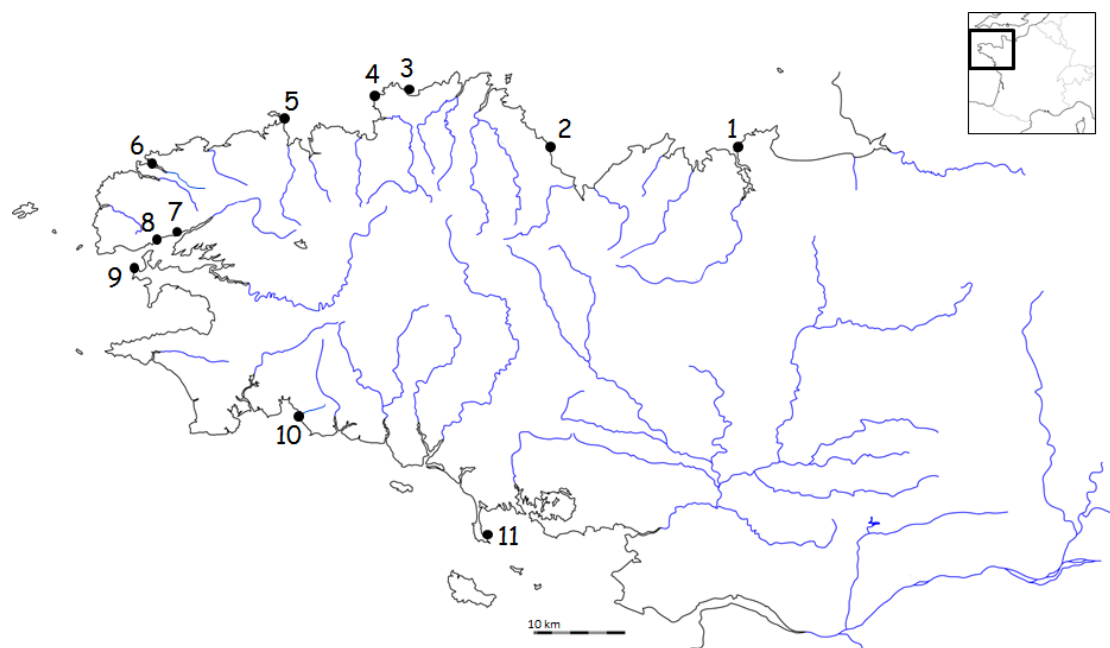
- Sato A, Satoh N, Bishop JDD (2012) Field identification of 'types' A and B of the ascidian *Ciona intestinalis* in a region of sympatry. *Mar Biol* 159:1611-1619.
- Sato A, Shimeld SM, Bishop JDD (2014) Symmetrical reproductive compatibility of the two species in the *Ciona intestinalis* (Acidiacea) species complex, a model for marine genomics and developmental biology. *Zool Sci* 31:369-374.
- Schierenbeck KA, Ellstrand NC (2009) Hybridization and the evolution of invasiveness in plants and other organisms. *Biol Invasions* 11:1093-1105.
- Shenkar N, Swalla BJ (2011) Global diversity of Ascidiacea. *PLoS ONE* 6, doi:10.1371/journal.pone.0020657.
- Simberloff D, Stiling P (1996) How risky is biological control? *Ecology* 77:1965-1974.
- Steeves TE, Maloney RF, Hale ML, Tylianakis JM et al (2010) Genetic analyses reveal hybridization but no hybrid swarm in one of the world's rarest birds. *Mol Ecol* 19:5090-5100.
- Suzuki MM, Nishikawa T, Bird A (2005) Genomic approaches reveal unexpected genetic divergence within *Ciona intestinalis*. *J Mol Evol* 61:627-635.
- Svane I, Havenhand JN (1993) Spawning and dispersal in *Ciona intestinalis* (L.). *Mar Ecol* 14:53-66.
- Zhan A, Macisaac HJ, Cristescu ME (2010) Invasion genetics of the *Ciona intestinalis* species complex: from regional endemism to global homogeneity. *Mol Ecol* 19:4678-4694.

Supplementary Information

Co-occurrence and reproductive synchrony do not ensure hybridization between an alien tunicate and its interfertile native congener

Sarah Bouchemousse^{1, 2*}, Laurent Lévêque^{1, 3}, Guillaume Dubois^{1, 2} and Frédérique Viard^{1, 2*}

Table S1. **Geographical coordinates and characteristics of each site**, i.e. open or closed marinas (by means of tidal or sill gates) at low tide, freshwater (estuarine) or marine influence.



Site	Coordinates	Open/ Closed	Estuarine/Marine
1- St Malo	48.638617; -2.026411	Open	Marine
2- St Quay	48.646136; -2.820925	Open	Marine
3- Perros Guirec	48.804877; -3.441954	Closed	Marine
4- Trébeurden	48.769510; -3.585811	Closed	Marine
5- Roscoff	48.717500; -3.965401	Open	Marine
6- Aber Wrac'h	48.598626; -4.562438	Open	Estuarine
7- Moulin Blanc	48.390365; -4.432140	Open	Estuarine
8- Château	48.379489; -4.489469	Open	Estuarine
9- Camaret-sur-Mer	48.279674; -4.596113	Open	Marine
10- Concarneau	47.870150; -3.914604	Open	Estuarine
11- Quiberon	47.488223; -3.103269	Open	Marine

Table S2. Detailed sampling size used for analyzing the reproductive status and proportions of the observed reproductive stages for *C. intestinalis* species A (N_{spA}) and species B (N_{spB}) at each study site and sampling date. Three categories were recorded: 1) immature individuals (imm), 2) individuals with sperm only (sp) and 3) individuals with both sperm and oocytes (sp+ooc).

A) Spring 2012

Site	Species A				Species B			
	N _{spA}	%imm	%sp	%sp+ooc	N _{spB}	%imm	%sp	%sp+ooc
1- St Malo	0	-	-	-	80	5.0	75.0	20.0
2- St Quay	10	0.0	80.0	20.0	70	7.1	62.9	30.0
3- Perros Guirec	38	0.0	31.6	68.4	53	7.5	83.0	9.4
4- Trébeurden	15	0.0	0.0	100.0	74	1.4	14.9	83.8
5- Roscoff	13	7.7	46.2	46.2	40	15.0	65.0	20.0
6- Aber Wrac'h	0	-	-	-	77	0.0	14.3	85.7
7- Moulin Blanc	23	26.1	65.2	8.7	64	64.1	28.1	7.8
8- Château	7	0.0	71.4	28.6	80	2.5	87.5	10.0
9- Camaret-sur-Mer	16	12.5	37.5	50.0	73	1.4	58.9	39.7
10- Concarneau	5	0.0	20.0	80.0	79	10.1	77.2	12.7
11- Quiberon	-	-	-	-	-	-	-	-
Mean	12.7	5.8	44.0	50.2	69	11.4	56.7	31.9
Standard deviation	11.5	9.5	27.3	31.2	13.2	19.1	27.6	29.6
Total	127	7.1	41.7	51.2	690	10.4	56.2	33.3

B) Autumn 2012

Site	Species A				Species B			
	N _{spA}	%imm	%sp	%sp+ooc	N _{spB}	%imm	%sp	%sp+ooc
1- St Malo	0	-	-	-	79	16.5	63.3	20.3
2- St Quay	42	7.1	42.9	50.0	45	28.9	53.3	17.8
3- Perros Guirec	69	1.4	36.2	62.3	30	23.3	63.3	13.3
4- Trébeurden	50	14.0	44.0	42.0	42	16.7	45.2	38.1
5- Roscoff	5	20.0	60.0	20.0	78	23.1	55.1	21.8
6- Aber Wrac'h	0	-	-	-	80	2.5	88.8	8.8
7- Moulin Blanc	41	31.7	34.1	34.1	42	45.2	26.2	28.6
8- Château	40	5.0	40.0	55.0	55	32.7	32.7	34.5
9- Camaret-sur-Mer	41	7.3	41.5	51.2	46	19.6	71.7	8.7
10- Concarneau	59	15.3	33.9	50.8	40	37.5	35.0	27.5
11- Quiberon	19	15.8	31.6	52.6	77	42.9	48.1	9.1
Mean	33.3	13.1	40.5	46.5	55.8	26.3	53.0	20.8
Standard deviation	23.8	9.2	8.5	12.7	18.9	12.8	18.4	10.4
Total	366	11.5	38.5	50.0	614	25.1	55.2	19.7

C) Spring 2013

Site	Species A				Species B			
	N _{spA}	%imm	%sp	%sp+ooc	N _{spB}	%imm	%sp	%sp+ooc
1- St Malo	0	-	-	-	80	23.8	38.8	37.5
2- St Quay	6	33.3	16.7	50.0	76	3.9	38.2	57.9
3- Perros Guirec	16	81.3	0.0	18.8	74	2.7	77.0	20.3
4- Trébeurden	28	28.6	39.3	32.1	73	2.7	68.5	28.8
5- Roscoff	0	-	-	-	115	9.6	47.0	43.5
6- Aber Wrac'h	0	-	-	-	80	20.0	72.5	7.5
7- Moulin Blanc	26	15.4	34.6	50.0	42	9.5	47.6	42.9
8- Château	0	-	-	-	80	21.3	56.3	22.5
9- Camaret-sur-Mer	11	27.3	45.5	27.3	75	6.7	56.0	37.3
10- Concarneau	0	-	-	-	80	32.5	62.5	5.0
11- Quiberon	2	0.0	0.0	100.0	80	3.8	63.8	32.5
Mean	8.1	31.0	22.7	46.4	77.7	12.4	57.1	30.5
Standard deviation	10.8	27.4	20.0	29.1	16.5	10.3	13.1	15.9
Total	89	33.7	29.2	37.1	855	12.6	57.0	30.4

D) Autumn 2013

Site	Species A				Species B			
	N _{spA}	%imm	%sp	%sp+ooc	N _{spB}	%imm	%sp	%sp+ooc
1- St Malo	0	-	-	-	80	7.5	52.5	40.0
2- St Quay	40	2.5	2.5	95.0	57	3.5	33.3	63.2
3- Perros Guirec	65	4.6	29.2	66.2	41	4.9	56.1	39.0
4- Trébeurden	40	5.0	15.0	80.0	43	2.3	25.6	72.1
5- Roscoff	0	-	-	-	80	11.3	56.3	32.5
6- Aber Wrac'h	0	-	-	-	80	3.8	58.8	37.5
7- Moulin Blanc	15	13.3	6.7	80.0	77	0.0	19.5	80.5
8- Château	43	4.7	11.6	83.7	70	1.4	12.9	85.7
9- Camaret-sur-Mer	40	5.0	27.5	67.5	60	3.3	36.7	60.0
10- Concarneau	40	10.0	25.0	65.0	58	1.7	22.4	75.9
11- Quiberon	13	0.0	53.8	46.2	72	6.9	54.2	38.9
Mean	26.9	5.0	19.5	75.5	65.3	4.2	38.9	56.8
Standard deviation	22.1	4.3	16.4	15.9	14.5	3.2	17.2	19.8
Total	296	5.0	19.0	76.0	718	4.5	39.7	55.8

E) Spring 2014

Site	Species A				Species B			
	N _{spA}	%imm	%sp	%sp+ooc	N _{spB}	%imm	%sp	%sp+ooc
1- St Malo	0	-	-	-	80	10.0	62.5	27.5
2- St Quay	4	0.0	25.0	75.0	79	0.0	40.5	59.5
3- Perros Guirec	31	12.9	51.6	35.5	67	6.0	29.9	64.2
4- Trébeurden	28	0.0	32.1	67.9	75	4.0	48.0	48.0
5- Roscoff	0	-	-	-	80	3.8	45.0	51.3
6- Aber Wrac'h	0	-	-	-	36	0.0	5.6	94.4
7- Moulin Blanc	0	-	-	-	80	31.3	15.0	53.8
8- Château	1	0.0	0.0	100.0	80	1.3	26.3	72.5
9- Camaret-sur-Mer	11	9.1	45.5	45.5	77	1.3	29.9	68.8
10- Concarneau	-	-	-	-	-	-	-	-
11- Quiberon	-	-	-	-	-	-	-	-
Mean	8.3	4.4	30.8	64.8	72.7	6.4	33.6	60.0
Standard deviation	12.5	6.2	20.2	25.4	14.4	9.9	17.4	18.6
Total	75	6.7	41.3	52.0	654	6.9	35.5	57.6

F) Autumn 2014

Site	Species A				Species B			
	N _{spA}	%imm	%sp	%sp+ooc	N _{spB}	%imm	%sp	%sp+ooc
1- St Malo	9	11.1	55.6	33.3	76	23.7	57.9	18.4
2- St Quay	27	0.0	11.1	88.9	65	10.8	40.0	49.2
3- Perros Guirec	79	6.3	36.7	57.0	27	22.2	55.6	22.2
4- Trébeurden	31	9.7	19.4	71.0	59	11.9	25.4	62.7
5- Roscoff	0	-	-	-	80	17.5	51.3	31.3
6- Aber Wrac'h	0	-	-	-	80	18.8	46.3	35.0
7- Moulin Blanc	34	5.9	14.7	79.4	76	11.8	21.1	67.1
8- Château	27	18.5	29.6	51.9	72	44.4	30.6	25.0
9- Camaret-sur-Mer	40	2.5	5.0	92.5	49	8.2	38.8	53.1
10- Concarneau	-	-	-	-	-	-	-	-
11- Quiberon	-	-	-	-	-	-	-	-
Mean	27.4	7.4	25.3	67.3	64.9	18.8	40.8	40.4
Standard deviation	24.3	6.0	19.0	22.2	17.6	11.0	13.2	18.1
Total	247	6.9	25.7	67.4	584	19.2	40.2	40.6

Table S3. **Proportions of admixture per locus, sampling date and maternal lineage** (i.e. identified with one species-diagnostic mitochondrial marker) for the 131 individuals that showed an admixed multilocus genotype with the three nuclear loci scored (i.e. CesA, Hox5 and vAChTP).

Generation	Maternal Lineage (mtDNA)	N_{ind}	%CesA	%Hox5	%vAChTP
Spring 2012	sp A	19	5.2	89.5	5.2
	sp B	2	100.0	0.0	0.0
Autumn 2012	sp A	44	2.3	97.7	0.0
	sp B	9	88.8	11.1	11.1
Spring 2013	sp A	10	0.0	100.0	0.0
	sp B	1	100.0	0.0	0.0
Autumn 2013	sp A	35	17.1	82.9	5.7
	sp B	11	100.0	27.3	9.1

Figure S1. **Monthly mean of seawater temperature (°C) recorded for this study using data loggers (Tidbit®v2) located at 1.5 m depth in most of the studied marinas (all except nos. 1, 2, 10, 11, in Fig. 2 in the main text).**

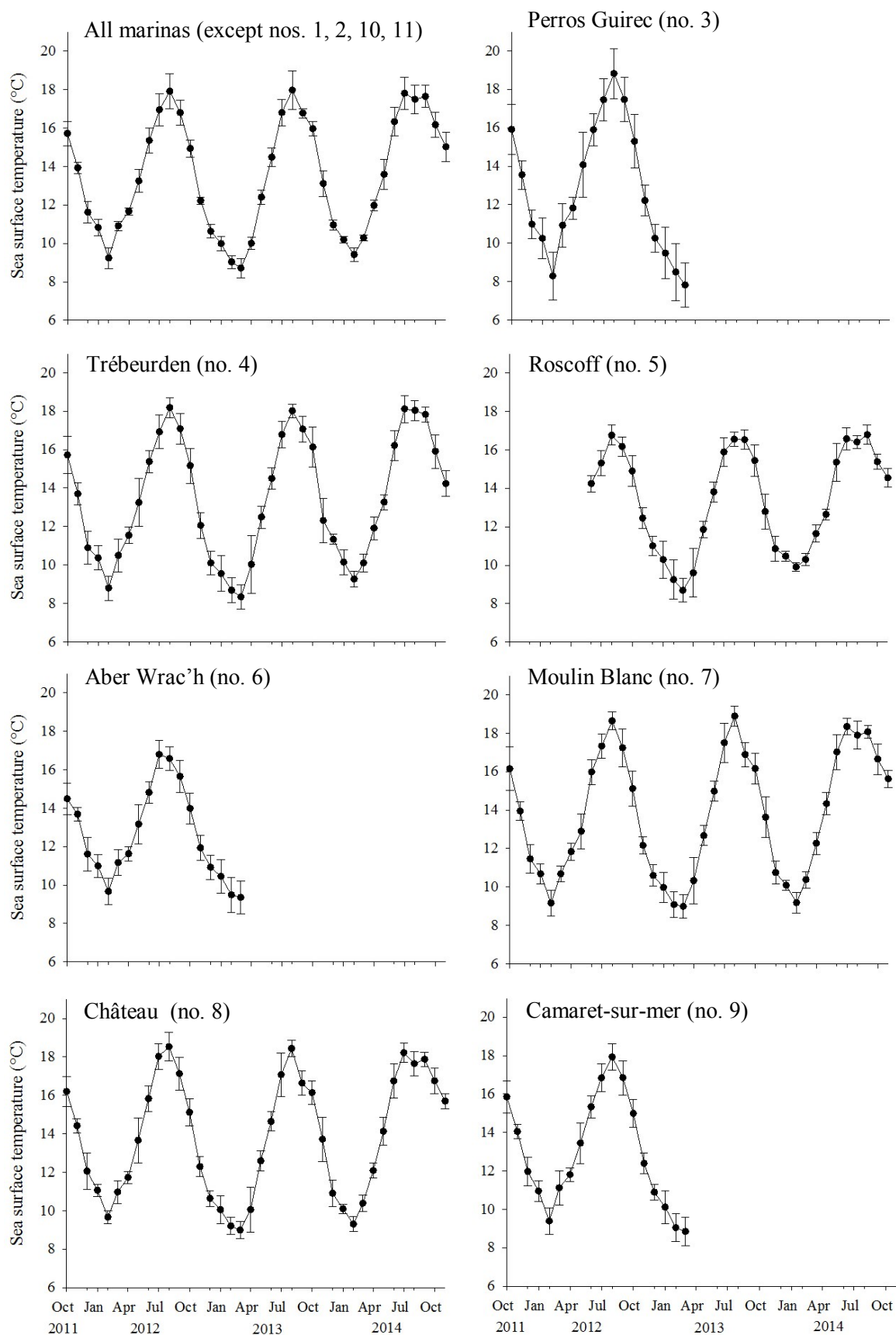
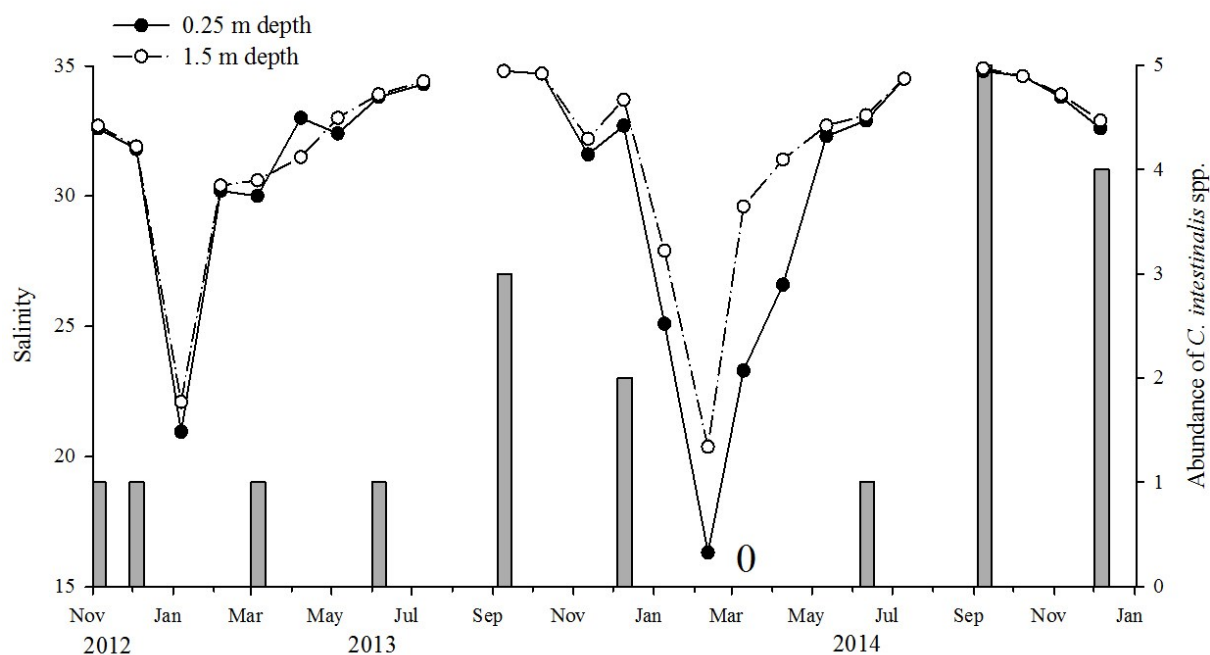


Figure S2. **Salinity values and abundance of *C. intestinalis* spp. recorded in Moulin Blanc** (no. 7 in Fig. 2 in the main text) **between November 2012 and December 2014**. Each month, salinity was recorded at two depths (0.25 m and 1.5 m) using a Hach Lange HQ40d multimeter equipped with a CDC 40115 conductivity probe. Every three months, the abundance of *C. intestinalis* spp. was estimated by SCUBA divers using a visual census method along ca. 30 m under one pontoon, according to a semi-quantitative scale (0 = absent, 1 = 0-20%, 2 = 20-40%, 3 = 40-60%, 4 = 60-80% and 5 = 80-100% of coverage).



- Chapitre 4 -

Quelle est l'importance relative des flux de gènes interspécifiques contemporains et historiques ?

I. Contexte et synopsis de l'étude

Dans l'étude précédente nous avons montré un fort potentiel d'hybridation entre *Ciona robusta* et *C. intestinalis* dans les populations naturelles. Mais, nous avons également mis en évidence un très faible taux d'individus (4.3% des 3000 individus étudiés) présentant un génotype avec des allèles des deux espèces et un seul individu avec un génotype attendu chez un hybride F1. Ces résultats convergent avec les données obtenues par Nydam & Harrison (2011) et Sato *et al.* (2014), soulignant de faibles flux de gènes interspécifiques en milieu naturel. Par ailleurs, un résultat important de notre étude était que le génotype maternel des individus possiblement issus d'hybridations ou d'introgessions était majoritairement de type *C. robusta*, ce qui ne correspond pas à celui attendu sur la base des fécondations expérimentales (les croisements hétérospécifiques impliquant des ovocytes de *C. robusta* montrant des taux de succès quasiment nuls). Ainsi nous avons avancé une explication alternative à des hybridations ou introgressions récentes, celle d'une introgression ancienne entre les deux espèces, introgression résultant d'un contact secondaire estimé avoir débuté il y a 15,000 ans (95% CI : entre 5,400 et 56,800 ans ; Roux *et al.* 2013).

Notre étude n'était basée que sur l'information fournie par 3 marqueurs nucléaires supposés diagnostiques. L'utilisation d'un plus grand nombre de marqueurs nucléaires répartis sur l'ensemble des génomes des deux espèces peut permettre une quantification des flux de gènes interspécifiques dans la zone de sympatrie et distinguer l'introgression actuelle et passée (Gompert *et al.* 2014; Nadeau 2014). Par ailleurs, l'utilisation d'un grand nombre de marqueurs dans des populations situées en dehors de la zone de sympatrie peut donner accès à une image globale des flux de gènes interspécifiques s'étant déroulé depuis le contact secondaire historique. Ce type d'approche peut également rendre compte de l'hétérogénéité (direction et intensité) de ces flux de gènes au niveau du génome, hétérogénéité conduisant à des génomes dits mosaïques. Ces flux de gènes interspécifiques sont certainement plus fréquents que précédemment supposé (Abbott *et al.* 2013; Harrison & Larson 2014) comme illustré chez le moustique *Anopheles gambiae* (Fontaine *et al.* 2015) ou chez les moules du genre *Mytilus* (Fraisie *et al.* 2015).

L'objectif de l'étude menée ici était donc 1) de valider ou invalider l'hypothèse d'une absence de flux de gènes contemporains entre *C. robusta* et *C. intestinalis* et 2) d'évaluer l'importance de l'introgression historique dans la zone de sympatrie. Cette étude a été menée par une approche de génomique des populations utilisant des marqueurs de type SNP (« Single Nucleotide Polymorphism »), en analysant des populations de *C. robusta* et *C. intestinalis* dans leur zone de sympatrie et en les comparant avec des populations échantillonnées en dehors de cette

zone. Ce travail fait l'objet d'un article présenté en section II de ce chapitre, rédigé pour une soumission dans la revue *Molecular Ecology*. Les points clés de cet article sont résumés ci-dessous.

Dans cette étude, nous avons utilisé les séquences analysées par Roux *et al.* (2013) et issues du Projet ERC 'PopPhyl' (N. Galtier ; ISEM) pour définir 384 marqueurs de type SNPs. Ces séquences proviennent des transcriptomes complets de 10 individus de chacune des deux espèces. Les individus ont été échantillonnés dans plusieurs régions de leurs aires de distribution (*C. robusta* : Californie et Méditerranée ; *C. intestinalis* : Nouvelle-Ecosse, Bretagne et Norvège). Ces 384 SNPs ont été choisis sur plusieurs critères, notamment leur répartition homogène dans le génome et leur position dans des régions considérées comme des points chauds d'introgression car présentant un enrichissement significatif en locus introgressés (Roux *et al.* 2013, Figure 4.1).

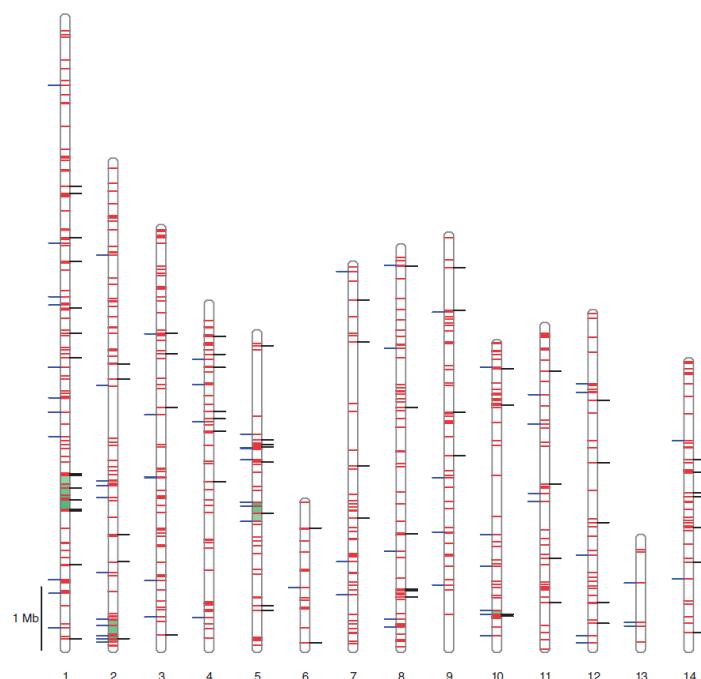


Figure 4.1. Distribution des points d'introgression le long des chromosomes du génome de *Ciona robusta*. Les locus utilisés dans l'étude de Roux *et al.* (2013) sont indiqués par des segments rouges. Les événements d'introgression de *C. intestinalis* vers *C. robusta* sont indiqués en bleu et de *C. robusta* vers *C. intestinalis* en noir. Les régions montrant un enrichissement significatif en locus introgressés sont représentées en vert (points chauds d'introgression). Figure tirée de Roux *et al.* (2013).

En utilisant la technique de génotypage GoldenGate VeraCode BeadXpress développée par Illumina, 310 marqueurs SNPs ont été génotypés avec succès chez 449 individus (213 de *C. robusta* et 236 de *C. intestinalis*) provenant de 8 localités situées dans la zone de sympatrie (7 d'entre elles caractérisées par une situation de syntopie des deux espèces) et 4 localités situées en dehors de la zone de contact contemporaine. Pour *C. robusta*, les populations allopatriques en question ont été échantillonnées au Chili et en Méditerranée et pour *C. intestinalis*, les populations allopatriques ont été échantillonnées aux Etats-Unis et en Suède. Deux hybrides F1, issus de croisements expérimentaux entre *C. robusta* et *C. intestinalis*, ont été ajoutés à l'analyse pour servir de témoins.

Le résultat brut du génotypage des 310 SNPs dans les populations naturelles est présenté dans la figure 4.2 : on remarque un important niveau de polymorphisme partagé et mais qui est variable selon les locus, illustrant la notion de génome mosaïque. Ce polymorphisme partagé peut avoir plusieurs origines : la convergence moléculaire, le polymorphisme ancestral conservé depuis la divergence entre les deux espèces, ou des flux de gènes interspécifiques entre les deux espèces. Remarquons ici que le même profil de polymorphisme est observé sur les 3 marqueurs nucléaires que nous avons utilisés, pour leur nature supposée diagnostique pour identifier *C. intestinalis* et *C. robusta* dans l'étude présentée dans le chapitre précédent, indiquant que ces marqueurs sont dans le meilleur des cas « pseudo-diagnostiques ».

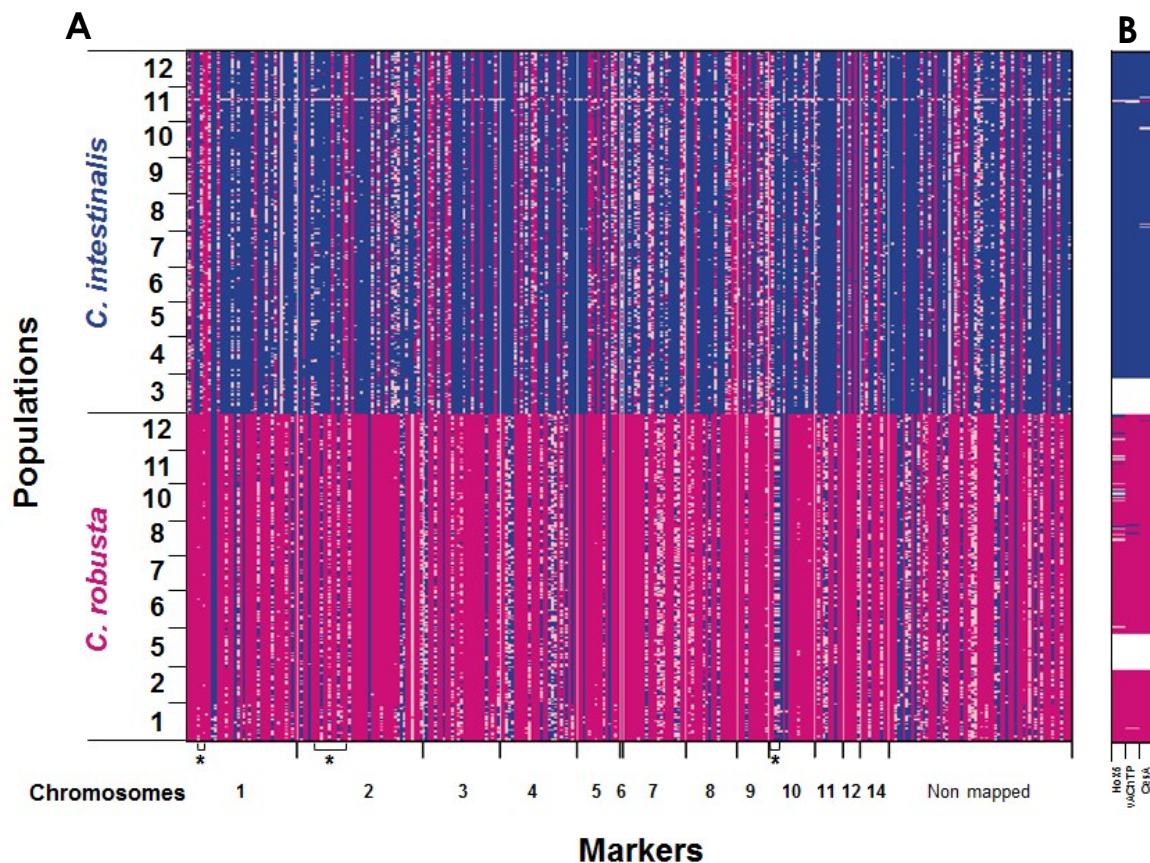


Figure 4.2. Représentation du polymorphisme observé avec (A) 310 locus SNPs et (B) 3 marqueurs nucléaires supposés diagnostiques (génotypés par PCR-RFLP) utilisés dans différentes études de l'hybridation entre *C. intestinalis* et *C. robusta* (Nydam & Harrison 2011 ; Caputi *et al.* 2007 ; Bouchemousse *et al.* 2015), sur 449 individus provenant de populations naturelles sympatriques (no. 5-12) ou allopatriques (no. 1-4) de *C. robusta* et de *C. intestinalis*. Les marqueurs (axe des abscisses) sont ordonnés en fonction de leur position le long des chromosomes. Les individus (axes des ordonnées) sont ordonnés par population (la correspondance entre les numéros et les sites est donnée dans le tableau 1 de l'article présenté en section II). Les cases rouge indiquent les génotypes homozygotes *C. robusta*, les cases bleu les génotypes homozygotes *C. intestinalis*, et les cases rose clair correspondent aux génotypes hétérozygotes (i.e. un allèle « *C. intestinalis* » et un allèle « *C. robusta* »). Les astérisques indiquent les locus positionnés dans les points chauds d'introgession définis par Roux *et al.* (2013). La population 5 (Falmouth) de *C. robusta* et la population 3 (US Nahant) de *C. intestinalis* n'ont pas été analysées pour les 3 locus nucléaires.

Ces marqueurs SNPs nous ont permis de réaliser une analyse du polymorphisme intra-spécifique des deux espèces étudiées, montrant notamment une moindre diversité génétique chez *C. robusta* par rapport à *C. intestinalis* sur l'ensemble des 239 locus polymorphes chez l'une ou/et l'autre des deux espèces. Mais l'objectif principal de cette étude était d'évaluer l'importance des flux de gènes interspécifiques actuels et passés. Pour cela nous avons utilisé 115 SNPs montrant des valeurs de structures génétiques (F_{ST}) supérieures à 0.8 entre les deux espèces (en utilisant les populations allopatriques). Les analyses utilisant ces 115 locus différenciés ont montré deux résultats majeurs. Premièrement, sur environ 350 individus échantillonnés dans la zone de sympatrie, seul un individu (issu de la population de Camaret, no. 11, Figure 4.2) a montré un profil génétique de type hybride F1 (i.e. hétérozygotes sur 97% des 115 locus), similaire à celui obtenu pour les hybrides expérimentaux. Cet hybride présentait un fond maternel de *C. intestinalis*, en accord avec le sens de croisement montrant de forts taux de succès de fécondation en laboratoire (Bouchemousse *et al.* 2015). Par ailleurs, aucun autre individu ne présentait de profils génétiques compatibles avec des croisements interspécifiques récents. Deuxièmement, les indices hybrides (i.e. correspondant à la proportion d'allèles d'une espèce dans le fond génétique de l'autre espèce) étaient très faibles, en moyenne de 0.006 et 0.012 dans les populations respectives de *C. robusta* et *C. intestinalis* de la zone de sympatrie (Figure 4.3). Et

ces indices étaient du même ordre de grandeur dans les populations allopatriques ; de façon inattendue, on note même une valeur moyenne de l'indice hybride supérieure au Chili par rapport aux autres populations de *C. robusta* (Figure 4.3).

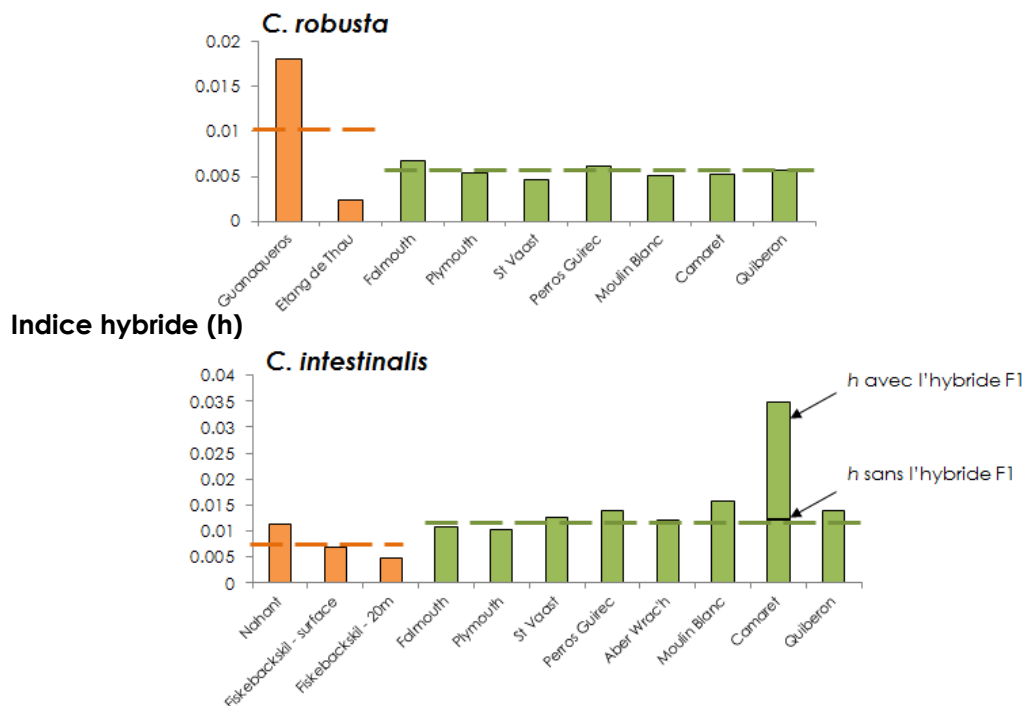


Figure 4.3. **Indices hybrides (h) estimés à partir de 115 SNPs** montrant un F_{ST} supérieur à 0.8 (en utilisant les populations allopatriques comme référence d'absence de flux de gènes contemporains) **pour chacune des populations allopatriques (en orange) et sympatriques (en vert) de *C. robusta* et *C. intestinalis*.** La valeur moyenne de l'indice hybride des populations allopatriques est indiquée par la ligne pointillée orange et celle des populations de la zone de sympatrie, par la ligne pointillée verte. On notera que la valeur moyenne de l'indice hybride dans les populations sympatriques de *C. intestinalis* a été calculée sans l'individu hybride F1 identifié à Camaret.

Les résultats de cette étude valident notre hypothèse de quasi absence de flux de gènes contemporains entre les deux espèces dans la zone de sympatrie et donc l'existence de mécanismes pré- et/ou zygotiques importants empêchant le croisement des deux espèces en milieu naturel. Par ailleurs, la présence d'introggression dans les populations allopatriques à un niveau équivalent à celui observé dans les populations sympatriques indique que les événements d'introggression et les flux de gènes interspécifiques sont anciens, très certainement en lien avec le contact secondaire mis en évidence par Roux *et al.* (2013). La large distribution géographique actuelle de l'introggression suggère que celle-ci s'est propagée à une échelle mondiale du fait des changements naturels de l'aire de distribution des deux espèces ainsi que par des processus plus récents d'introductions biologiques. Une région mériterait une attention plus particulière : le SE Pacifique (ici représenté par une population du Chili (Guanaqueros, Figure 4.3 et no.1, Figure 4.2)). En effet un profil d'introggression atypique y a été observé suggérant un possible introggression adaptative spécifique à cette région ou à la population source de cette région (*C. robusta* étant considérée comme une espèce introduite dans cette zone géographique).

Cette étude a été menée en collaboration avec Cathy Haag-Liautard et Nicolas Bierne de l'Institut des Sciences de l'Evolution de Montpellier.

Ces travaux ont été présentés sous la forme de poster à deux congrès internationaux : le congrès de la Society for Molecular Biology and Evolution (Mai 2015, Montpellier, France) et le symposium Invasion Genetics : The Baker and Stebbins legacy (Aout 2014, Asilomar CA, USA)

II. Article 3

Past and contemporary introgression between two strongly differentiated *Ciona* species as revealed by post-genomic SNP panel

Sarah Bouchemousse¹, Cathy Haag-Liautard^{2, 3}, Nicolas Bierne^{2, 3} and Frédérique Viard^{1, *}

¹ Sorbonne Universités, UPMC Univ Paris 6, CNRS, UMR 7144, Equipe Div&Co, Station Biologique de Roscoff, Place Georges Teissier, 29680 Roscoff, France

² Université Montpellier 2, Station Méditerranéenne de l'Environnement Littoral, 2 Rue des Chantiers, 34200 Sète, France

³ CNRS-UM2-IRD, UMR 5554, Institut des Sciences de l'Evolution, Place Eugène Bataillon, 34095 Montpellier, France

*Correspondence : UMR7144, Equipe Diversité et Connectivité dans le paysage marin Côtier (Div&Co), CNRS-UPMC, Station Biologique de Roscoff, 29680 Roscoff, France

Email: viard@sb-roscoff.fr

En préparation pour le journal *Molecular Ecology*

Abstract

One important outcome of biological introductions is to bring into contact species that diverged in allopatry. For interfertile taxa, the evolutionary outcomes of such secondary contacts may be diverse (e.g. adaptive introgression from or into the introduced species) but are not yet well examined in the wild. In this context, the recent secondary contact between the non-native species *Ciona robusta* and the native species *C. intestinalis*, in the English Channel, provides an excellent case study to examine. By means of a population genomic approach, using 310 SNPs developed from full transcriptomes, the genetic diversity at population and species level was examined by studying 449 individuals ($N_{C.robusta} = 213$, $N_{C.intestinalis} = 236$) sampled in 12 sites from the English Channel, North Sea, NW Atlantic and SE Pacific where they are found either alone or living in the same locality and habitat (syntopy). As expected from previous analyses, *C. robusta* showed less polymorphism than *C. intestinalis*, a pattern that may partly be explained by its non-native status in most of the study localities. The results clearly showed an almost complete absence of contemporary gene flow between the two species in syntopic localities, with only one first generation hybrid and no other genotype compatible with recent backcrosses. Interestingly, introgression was also observed in allopatric populations of both species (i.e. where no contemporary hybridization can occur). Furthermore, one allopatric population sampled in SE Pacific exhibited a much higher introgression rate compared to all other *C. robusta* populations. Altogether, these results indicate that the observed inter-specific gene flow is the outcome of historical introgression, spread afterward at a worldwide scale. They also point out that efficient barriers are preventing hybridization in the wild between the introduced and native species in the English Channel, thus making adaptive introgression of the introduced species unlikely to favor the sustainable establishment of the study species.

Keywords: Biological invasions, *Ciona* spp., Tunicates, Hybridization, Species range, Population genomics

Introduction

Speciation is a gradual spatio-temporal process during which geographical or ecological isolation decreases gene flow between groups of individuals thereby contributing to the emergence of new species (Abbott *et al.* 2013). Species range shifts in response to long-term environmental changes can deeply modify the evolution of these emerging novel species by promoting the formation of contact zones (Hewitt 2004; Swenson & Howard 2005; Maggs *et al.* 2008). In cases of species that are not fully reproductively isolated, interspecific gene flow may create hybrid zones (Barton 1979). Hybridization and introgression processes in contact zones between species are particularly interesting for studying intrinsic and extrinsic barriers responsible of the maintenance of species boundaries (Hewitt 1988; Orr & Smith 1998; Turelli *et al.* 2001; Abbott *et al.* 2013; Harrison & Larson 2014).

In last few years, next generation sequencing techniques have revolutionized the study of hybridization and speciation processes (for a review, Seehausen *et al.* 2014). For instance, recent population genomic studies provided evidences that adaptive introgression can occur between divergent species and may probably be more common than previously expected (Abbott *et al.* 2013; Hedrick 2013). The evolutionary history of the modern human (for a review, Racimo *et al.* 2015), the malaria vector mosquito *Anopheles gambiae* (Fontaine *et al.* 2015), *Heliconius* butterflies (Pardo-Diaz *et al.* 2012) and *Mytilus* mussels (Fraisie *et al.* 2015) are particularly well-documented cases illustrating such processes.

Most of these studies are concerned with historical interspecific gene flow which occurred during long-term range expansion (see Currat *et al.* (2008) for theoretical supports and review of empirical evidences). And yet adaptive introgression may theoretically occur on shorter time, particularly in light of biological introduction processes (i.e. transport of species away from their native range via human activities, Elton 1958) which modify species distributions at a global scale and an unprecedented rate (e.g. for a review in marine ecosystem, Molnar *et al.* 2008). Biological introduction processes are particularly interesting case studies to examine regarding the fate of secondary contacts between previously allopatric and non-reproductively isolated species. A diverse set of consequences of hybridization between native and non-native taxa are expected (Allendorf *et al.* 2001) for instance, the extinction of the native species (Rhymer & Simberloff 1996) or the introgression of advantageous alleles from the native into the non-native species facilitating local adaptation of the non-native species to its new colonized environment. Opposite situations were reported also in the literature, i.e. the rapid fixation of non-native alleles, called “*super invasive alleles*”, in the genome of native species (Hohenlohe *et al.* 2013), for example between the non-native Barred Tiger salamanders and the native California species (Fitzpatrick *et al.* 2010).

In this context, we consider two newly distinguished although strongly differentiated species in the genus *Ciona*. These two species were first considered as cryptic species of the *Ciona intestinalis* species complex and named *C. intestinalis* type A and *C. intestinalis* type B (Nydam & Harrison 2007; Zhan *et al.* 2010). Following recent taxonomic revision, they are now formally accepted as two distinct species (WoRMS database) and named *C. robusta* Hoshino & Tokioka, 1967 and *C. intestinalis* (Linnaeus, 1767), respectively (Brunetti *et al.* 2015). They display a divergence estimated at ca. 4 Mya that has been followed by a secondary contact estimated to have occurred 15,500 years ago (95% CI: 4,300 - 56,800) and since this event ca. 20% of loci presumably crossed the species barriers in both directions (estimations based on full transcriptome data, Roux *et al.* 2013). Currently, the two species, and particularly *C. robusta*, display a wide distribution over several distinct biogeographic regions because both have been introduced due to human-activities (Procaccini *et al.* 2011). For instance, *C. robusta*, assumed to be native to NW Pacific (Japan), is reported in SE Pacific (Chile and Peru) and NE Pacific (California), SE and SW Atlantic (S. Africa and Brazil), NE Atlantic (Europe). The two taxa live in sympatry in one region only, namely in the Northeast Atlantic (i.e. Western English Channel and South of Brittany) due to the recent introduction *C. robusta* (ca. in recent decades; Nydam & Harrison 2011; J.D.D. Bishop,

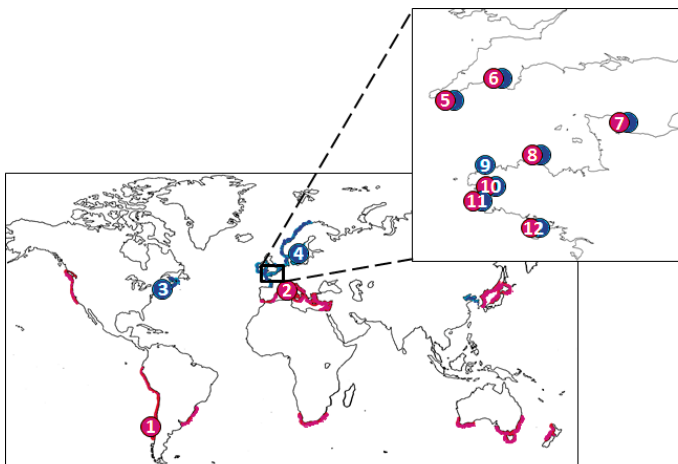
personal observation) into the European native range of *C. intestinalis*. The two taxa are thus excellent models to examine as having been repeatedly in secondary contact, in past- and present times.

Despite their ancient divergence, the two species are apparently not yet reproductively isolated and F1 hybrids are easily obtained under laboratory conditions (Suzuki *et al.* 2005; Bouchemousse *et al.* 2015). Based on a few nuclear markers, recent field and molecular studies carried out in the only sympatric range described so far (i.e. NE Atlantic) however cast doubts on the likelihood of contemporary hybridization: despite a close syntopy and reproductive synchrony, by using a small set of nuclear markers, only very rare F1-hybrids were observed in the wild (Nydam & Harrison 2011; Bouchemousse *et al.* 2015). In addition, only a limited amount of interspecific admixture was observed leading to the hypothesis that these admixture patterns may be the outcome of historical introgression events rather than contemporary backcross events. To test this hypothesis and better examine the relative extent of past- and contemporary inter-specific gene flow between the two species, we used a population genomic approach based on ca. 300 SNPs derived from full transcriptomic sequences (Roux *et al.* 2013) by examining the genetic diversity of the two species sampled in eight localities of the sympatric range and two localities for each species outside contact zones (i.e. allopatric populations). This study is the first population SNP-based study in an ascidian species despite the importance of this taxonomic group in evolutionary biology, development biology and phylogeny (Shenkar & Swalla 2011; Satoh *et al.* 2014), and particularly regarding the *C. intestinalis* species complex (Procaccini *et al.* 2011).

Materials and Methods

Sampling

We aimed at examining *Ciona robusta* and *C. intestinalis* within their contemporary sympatric range (i.e. Western English Channel and South of Brittany). Sampling was done in seven localities where the two species are living in syntopy (i.e. living in the exact same habitat) and one locality where surveys carried out over several years never reported the presence of *C. robusta* (i.e. only *C. intestinalis* is present; no.9 in Fig. 1 and Table 1; Bouchemousse *et al.* 2015). For comparison, populations from localities outside of the contemporary contact zone (i.e. where a single species has been recorded so far) were sampled: for *C. robusta*, two localities of the SE Pacific and Mediterranean Sea, and for *C. intestinalis*, two localities in the North Sea (one in shallow water and one at 20-meters depth) and one in the NW Atlantic (Fig. 1, Table 1). For each individual, DNA extraction was performed with Nucleospin® 96 Tissue Kit according to the manufacturer's protocol (Macherey-Nagel, Germany). A minimum of 24 individuals per population was selected based on the DNA quality following extraction. Altogether a total of 449 individuals, 213 for *C. robusta* and 236 for *C. intestinalis*, were further analyzed. Note that the assignment to *C. robusta* and *C. intestinalis* was based both on morphological features (Sato *et al.* 2012; Brunetti *et al.* 2015) and a maternal species-diagnostic mitochondrial locus (mtCOI; Nydam & Harrison 2007).



In addition to specimens sampled in natural populations, two F1-hybrids produced from experimental crosses (Bouchemousse *et al.* 2015) were included as control for F1-hybrid genotype.

Figure 1. **Distribution** (dark pink line for *C. robusta* and blue line for *C. intestinalis*) and **study locations** (red points for *C. robusta* and blue points for *C. intestinalis*). See Table 1 for population labels.

Table 1. **Study localities, hybrid index (*h*) and number of hybrids *sensu lato*** (i.e. F1, F2 hybrids and backcrosses with parental species) **in each population of *Ciona robusta* and *C. intestinalis*.**

Regional status and *locality status* indicate if the two species have been reported to co-exist at a regional scale (allopatric vs. sympatric) or at the locality level (syntopic vs. non-syntopic). In this table, *h* is defined as the proportion of alleles from one species in the genetic background of the other species (i.e. proportion of *C. intestinalis* alleles over all loci in *C. robusta* individuals and proportion of *C. robusta* alleles over all loci in *C. intestinalis* individuals). *h* values were averaged across individuals for each sampled locality. Analyses were done with 115 SNPs selected for interspecific gene flow analyses ($F_{ST} > 0.8$).

N°	Locality	Region	Introduced vs. native status	Regional status	Locality status	Sampling year	Nind	Hybrid index (mean \pm SD)	Number of hybrids
<i>C. robusta</i>									
1-	Guañaqueros, Chile	South Eastern Pacific	Introduced	Allopatric	Non-syntopic	2012	24	0.0181 \pm 0.0081	0
2-	Etang de Thau	Mediterranean Sea	Introduced	Allopatric	Non-syntopic	2013	23	0.0023 \pm 0.0037	0
5-	Falmouth	English Channel	Introduced	Sympatric	Syntopic	2013	24	0.0067 \pm 0.0044	0
6-	Plymouth	English Channel	Introduced	Sympatric	Syntopic	2011	24	0.0054 \pm 0.0047	0
7-	St Vaast	English Channel	Introduced	Sympatric	Syntopic	2012	23	0.0047 \pm 0.0037	0
8-	Perros Guirec	English Channel	Introduced	Sympatric	Syntopic	2011	24	0.0062 \pm 0.0046	0
10-	Moulin blanc	Bay of Brest	Introduced	Sympatric	Syntopic	2012	24	0.0051 \pm 0.0044	0
11-	Camaret	Bay of Brest	Introduced	Sympatric	Syntopic	2011, 2012	24	0.0053 \pm 0.0041	0
12-	Quiberon	Bay of Biscay	Introduced	Sympatric	Syntopic	2012, 2013	23	0.0057 \pm 0.0036	0
Total							213	0.0066 \pm 0.0063	
<i>C. intestinalis</i>									
3-	Nahant	North Western Atlantic	Cryptogenic	Allopatric	Non-syntopic	2013	24	0.0114 \pm 0.0078	0
4a-	Fiskebackskil – surface	North Sea	Native	Allopatric	Non-syntopic	2010	12	0.0069 \pm 0.0051	0
4b-	Fiskebackskil - 20m depth					2010	12	0.0047 \pm 0.0034	0
5-	Falmouth	English Channel	Native	Sympatric	Syntopic	2011	24	0.0107 \pm 0.0056	0
6-	Plymouth	English Channel	Native	Sympatric	Syntopic	2011	24	0.0103 \pm 0.0067	0
7-	St Vaast	English Channel	Native	Sympatric	Syntopic	2012	23	0.0127 \pm 0.0079	0
8-	Perros Guirec	English Channel	Native	Sympatric	Syntopic	2011, 2012	24	0.0140 \pm 0.0068	0
9-	Aber Wrac'h	English Channel	Native	Sympatric	Non-syntopic	2011, 2012	23	0.0121 \pm 0.0064	0
10-	Moulin blanc	Bay of Brest	Native	Sympatric	Syntopic	2011	24	0.0158 \pm 0.0082	0
11-	Camaret	Bay of Brest	Native	Sympatric	Syntopic	2011, 2012	22	0.0348 \pm 0.1060	1 (F1-hybrid)
	<i>without F1 -hybrid</i>						21	0.0122 \pm 0.0064	0
12-	Quiberon	Bay of Biscay	Native	Sympatric	Syntopic	2011, 2012	24	0.0140 \pm 0.0090	0
Total							236	0.0140 \pm 0.0331	1 (F1-hybrid)
Total (without F1-hybrid)							235	0.0119 \pm 0.0074	0

Loci selection and genotyping

An Illumina BeadXpress® with Veracode™ technology (GoldenGate® Genotyping Assay) was used to genotype 384 single nucleotide polymorphisms (SNPs) developed from full transcriptomes of 10 individuals of *C. robusta* and 10 individuals of *C. intestinalis* (details in Roux *et al.* (2013)). The selection of these 384 loci was optimized to maximize the success of genotyping (i.e. not close to exon borders, few degenerate bases in the primer sequences, minor allele frequency ≤ 0.1 at each SNP). Based on the results by Roux *et al.* (2013), these loci could be sorted according to four categories of polymorphism (Table 2): 1) SNPs differentially fixed between the two species (sf), 2) SNPs polymorphic in *C. robusta* (sxA) but not in *C. intestinalis*, 3) SNPs polymorphic in *C. intestinalis* (sxB) but not in *C. robusta* and 4) SNPs displaying polymorphism in the two species (ss). The full SNP panel is intentionally not random: the 384 SNPs were selected to be spread over most of the chromosomes of the published genome of *C. robusta* (Dehal *et al.* 2002; note that the genome is still indicated as *C. intestinalis* type A or even *C. intestinalis* genome according to the genome databases) and 25 of them were localized in introgression hotspots identified by Roux *et al.* (2013). We enriched the panel with sf (101) and ss (47) SNPs and equalized the number of sxA (109) and sxB (127) SNPs as *C. intestinalis* is more polymorphic than *C. robusta*. However, we have a subset of 70 SNPs that strictly reflect the genome wide site frequency spectrum. Genotyping was performed using Genome Studio software (Illumina Inc.). Out of the 384 SNPs, 324 SNPs amplified successfully and 310 SNPs were retained for further statistical analyses as they displayed a high rate of genotyping success (a minimum of 97% of the individuals without missing data) and an unambiguous genotype assignment. Details regarding the physical mapping of these loci are provided in Figure S1 and Table S1.

Table 2. Number of SNPs per category defined according to their polymorphism patterns: 1) sf: loci differentially fixed between the two species; 2) sxA: loci polymorphic in *Ciona robusta* only; 3) sxB: loci polymorphic in *C. intestinalis* only; 4) ss: polymorphism shared by the two species. The number of SNPs in each category is given according to the sorting made using the dataset from which the loci were designed (Roux *et al.* 2013) and according to the results of the present study.

		Distribution based on the results of the present study					Not genotyped or polymorphic	Total
		sf	sxA	sxB	ss	Total		
Distribution based on data from Roux <i>et al.</i> (2013)	sf	64	3	26	1	94	7	101
	sxA	0	71	1	17	89	20	109
	sxB	0	0	99	3	102	25	127
	ss	1	1	2	21	25	22	47
Total		65	75	128	42	310	74	384

Intraspecific analysis

In order to compare populations of the two species between sympatric and allopatric areas or syntopic and non-syntopic localities, genetic studies at the species level were carried out for both *C. robusta* and *C. intestinalis*. To picture the overall distribution of the genetic diversity in the dataset (i.e. 310 loci), a Principal Component Analysis (PCA) was carried out using the R package ADEGENET v.1.4 (Jombart & Ahmed 2011; R Development Core Team 2010). Then, only those loci that are relevant for intra-specific analyses (i.e. polymorphic at the species level, neutral, in linkage equilibrium) were selected. Firstly, loci that were differentially fixed between the two species (i.e. 65 loci sf), and thus monomorphic in both species, were removed. Secondly, linkage disequilibrium between loci was investigated as some of them would be on the same contig and chromosome. Linkage disequilibrium between loci was tested, for each species separately, over the whole dataset and in each population sample using GENEPOP v.4.0.6 (Rousset 2008) with default parameters. To adjust *P*-values from multiple tests, *Q*-values were computed using QVALUE package implemented in R. Thirdly, being interested by analyzing gene flow and genetic drift, outlier loci, i.e. loci displaying atypical genetic differentiation as compared to those expected under neutral expectations, were removed from the analyses. The outliers were identified using a

Bayesian method with a logistic regression model implemented in BAYESCAN v.2.1 software (Foll & Gaggiotti 2008) with default parameters.

Genetic diversity. At the intra-specific level, for each population, the number of polymorphic loci and the expected heterozygosity (H_e) were estimated using GENETIX v.4.05 software (Belkhir *et al.* 2004). Fixation index (F_{IS}) was estimated and departures from Hardy-Weinberg equilibrium were tested in each population using GENEPOP with default parameters for tests. P -values resulting of multiple tests were adjusted using the QVALUE package. In addition, to compare the genetic diversity between species, H_e was estimated using all the loci available across the two species (i.e. 239 loci, including monomorphic loci in one or the other of the two species). Genetic diversity indices were compared by permutation tests using the R package *coin* (Hothorn *et al.* 2008).

Genetic structure. Genetic structure between populations was analyzed by estimating the fixation index F_{ST} (Wright 1951) using GENEPOP. Exact G tests for population differentiation were carried out using 10,000 random permutations. To visualize the genetic structure between populations, a Principal Component Analysis (PCA) was computed for each species separately. The genetic structure was also investigated using a Bayesian clustering method implemented in STRUCTURE v.2.3 (Pritchard *et al.* 2000). This method used MCMC to generate posterior probabilities of assignment of each individual genotype to a number of clusters (K). For each K (from 1 to the number of sampling sites, 9 for *C. robusta* and 11 for *C. intestinalis*), ten replicates of 150,000 MCMC after a period of 50,000 burn-in cycles were run. We employed the admixture model with correlated allele frequencies with an *a priori* on the population origin of individuals to assist the clustering (LOCPRIOR model) following recommendations of Hubisz *et al.* (2009) for species with a low level of population structure. The most likely number of clusters was determined using ΔK method established by Evanno *et al.* (2005) implemented in the online software STRUCTURE HARVESTER v.0.6.94 (Earl & vonHoldt 2011). Results were summarized across all replicate runs using CLUMPP v.1.1.2 (Jakobsson & Rosenberg 2007) and visualized with DISTRUCT v1.1 (Rosenberg 2004).

Interspecific and genome admixture analysis

To examine inter-specific gene flow at the genome level, we selected 115 loci that were the most differentiated loci according to F_{ST} values computed between the two species using allopatric populations (as reference for the absence of contemporary interspecific gene flow; Figure S2). For each individual, the maximum likelihood value of hybrid index was estimated using the R package INTROGRESS (Gompert & Buerkle 2010). The hybrid index (h) is defined as the proportion of *C. intestinalis* alleles over all loci ($h = 0$ for individuals with *C. robusta* alleles only and $h = 1$ for individuals with *C. intestinalis* alleles only). To visualize and compare the genomic architecture of interspecific admixture at the individual level, the *mk.image* function implemented in INTROGRESS was used.

To identify putative F1- or recently introgressed individuals (product of several generations of backcrosses within the sympatric range), a Bayesian clustering method implemented in NEWHYBRID software v.1.1 was used (Anderson & Thompson 2002). Briefly, this method computes posterior probability for assigning a given individual to different hybrid categories (i.e. F1, F2-hybrids and backcrosses with parental *C. robusta* or *C. intestinalis* individuals) or parental species, using Markov chain Monte Carlo algorithms (MCMC). Here, 150,000 MCMC after a period of 50,000 burn-in cycles was run.

Results

Diversity of the SNP panel

Overall, 451 individuals (including the two F1-hybrids from experimental crosses) were genotyped successfully at 310 SNPs defined from a transcriptome dataset of *Ciona robusta* and *C. intestinalis* (Roux *et al.* 2013). Following this genotyping, the distribution of SNPs across the categories, originally defined from a small sample of 10 specimens for each species, was modified, as shown in Table 2. The most substantial change was a decrease of the sf and sxA categories (i.e.

a decrease of 31% and 22%, respectively) and a concomitant increase of the sxB and ss categories (17% and 22%, respectively). We considered these new categories in the analyses below.

Differences in intra-specific genetic diversity and structure in the two study species

No loci pairs showed linkage disequilibrium in *C. intestinalis* and only one in *C. robusta* (snp373 and snp185). Locus no.373, showing the lowest value of minor allele frequency was removed from further analyses. Five outliers (one in *C. robusta* and four in *C. intestinalis*) were identified with BAYESCAN analyses: one of them showed the signature of positive selection in the allopatric SE Pacific population (i.e. snp43 Figure S3; BAYESCAN analyses) and four loci showed strong evidence of positive selection in *C. intestinalis*, mostly differentiating the two North Sea populations (Figure S4). These five loci were removed from further analyses. Altogether, 239 loci were retained: 115 and 166 polymorphic, independent and neutral loci, in *C. robusta* and *C. intestinalis*, respectively, including 42 polymorphic loci found in the two datasets.

Table 3 provides genetic diversity indexes for each population studied of *C. robusta* and *C. intestinalis*. Comparisons of values of expected heterozygosity (H_e), estimated from the 239 loci showing polymorphism in at least one of the two species, revealed that expected heterozygosity is significantly higher in populations of *C. intestinalis* than those of *C. robusta*, over all localities (permutation test, $test.value = -3.275$, $P < 0.001$) as well as within the sympatric range of the two species ($test.value = -3.694$, $P < 0.001$).

Table 3. Genetic diversity indices and fixation index of each study population for *Ciona robusta* and *C. intestinalis*.

N°	Locality	Introduced vs. native status	P _{loc}	H _e (mean ± SD)	H _e (mean ± SD) – 239 shared loci	F _{IS}
C. robusta						
1-	Guañeros	Introduced	107	0.294 ± 0.177	0.142 ± 0.192	-0.014
2-	Etang de Thau	Introduced	77	0.233 ± 0.207	0.112 ± 0.185	-0.013
5-	Falmouth	Introduced	80	0.247 ± 0.212	0.119 ± 0.192	-0.052
6-	Plymouth	Introduced	80	0.239 ± 0.205	0.115 ± 0.186	-0.048
7-	St Vaast	Introduced	80	0.239 ± 0.202	0.115 ± 0.185	-0.078
8-	Perros Guirec	Introduced	81	0.245 ± 0.205	0.118 ± 0.189	-0.024
10-	Moulin blanc	Introduced	80	0.236 ± 0.202	0.114 ± 0.183	-0.042
11-	Camaret	Introduced	82	0.245 ± 0.205	0.118 ± 0.188	-0.022
12-	Quiberon	Introduced	83	0.253 ± 0.206	0.122 ± 0.191	-0.026
	Total (Sympatric pop.)		87	0.248 ± 0.200	0.119 ± 0.186	
	Total		115	0.259 ± 0.189	0.125 ± 0.185	
C. intestinalis						
3-	Nahant	Cryptogenic	116	0.215 ± 0.191	0.147 ± 0.189	-0.016
4a-	Fiskebackskil - surface	Native	99	0.185 ± 0.194	0.126 ± 0.182	0.023
4b-	Fiskebackskil - 20m depth		83	0.165 ± 0.196	0.112 ± 0.178	-0.007
5-	Falmouth	Native	122	0.216 ± 0.191	0.148 ± 0.187	-0.029
6-	Plymouth	Native	131	0.213 ± 0.187	0.146 ± 0.184	-0.009
7-	St Vaast	Native	131	0.217 ± 0.186	0.149 ± 0.185	-0.023
8-	Perros Guirec	Native	128	0.220 ± 0.193	0.151 ± 0.190	-0.047
9-	Aber Wrac'h	Native	126	0.223 ± 0.191	0.153 ± 0.189	-0.021
10-	Moulin blanc	Native	130	0.225 ± 0.188	0.155 ± 0.187	0.009
11-	Camaret	Native	127	0.220 ± 0.189	0.151 ± 0.187	-0.020
12-	Quiberon	Native	125	0.224 ± 0.192	0.153 ± 0.190	-0.019
	Total (Sympatric pop.)		166	0.223 ± 0.182	0.152 ± 0.183	
	Total		166	0.224 ± 0.181	0.152 ± 0.182	

P_{loc}: number of polymorphic loci and H_e: expected heterozygosity over 115 and 166 loci retained for intra-specific analyses in *C. robusta* and *C. intestinalis* respectively; H_e-239 loci: expected heterozygosity over the 239 loci shared by both species (115 and 166 polymorphic, independent and neutral loci in *C. robusta* and *C. intestinalis*, respectively including 42 polymorphic loci found in the two datasets), F_{IS}: fixation index (no deviation from Hardy-Weinberg equilibrium; exact test, $P < 0.05$)

Diversity and genetic structure in populations of *C. robusta*

Values of H_e were similar across populations of *C. robusta*, ranging from 0.233 (no.2) to 0.294 (no.1). No departure from Hardy-Weinberg equilibrium (HWE) was found in any of the study populations. Exact tests of differentiation revealed significant differences in allele frequencies among all populations sampled and among populations of the sympatric range (Table 4). A major part of the genetic structure was explained by a significant genetic differentiation of the SE Pacific population (no.1) with all of the other populations (pairwise comparisons provided in Table S2a). PCA (Figure 2a) well-illustrated this finding, with a differentiation along the first axis explained by the genetic difference between population no.1 and the other populations. Individual Bayesian assignments from STRUCTURE analysis (Fig. 3a) with two clusters (the most likely number of clusters according to ΔK value) also indicated that individuals from population no.1 all belong to one given genetic cluster whereas all the other study individuals are assigned to a second cluster. When examining the genetic configuration using three clusters, the individuals not sampled in SE Pacific (no.1; assigned to cluster 1) were assigned to one of the two other genetic clusters (cluster 2; dark red in Fig 3a) but with more admixture in the two populations from UK (no.5 and 6; individuals membership to cluster 3 ranged between 24% and 48%). Altogether, SE Pacific and to a lesser extent UK populations were the most different genetically.

Table 4. Genetic structure among populations for *Ciona robusta* and *C. intestinalis*.

	F_{ST}	P-value
<i>C. robusta</i>		
All sampled populations (9 populations)	0.049	$P < 0.001$
All populations without Guanaqueros (all except no.1)	0.023	$P < 0.001$
Sympatric populations (all except no.1 and 2)	0.021	$P < 0.001$
<i>C. intestinalis</i>		
All sampled populations (11 populations)	0.039	$P < 0.001$
All populations without Fiskebackskil (all except no.4a and 4b)	0.017	$P < 0.001$
Sympatric populations (all except no.3, 4a and 4b)	0.011	$P = 0.273$

Diversity and genetic structure in populations of *C. intestinalis*

Values of H_e were similar among the study populations, ranging from 0.213 (no.6) to 0.225 (no.10), except for the populations from the North Sea which exhibited lower values of H_e (i.e. 0.185 and 0.165 for no.4a and 4b respectively). As for *C. robusta*, no departure from HWE was observed. Exact tests of differentiation between *C. intestinalis* populations indicated significant differences among all populations but not between populations of the sympatric range (Table 3). The overall significant genetic structure was mainly due to 1) a strong and significant genetic differentiation of the populations sampled in the two allopatric regions (no.3, 4a and 4b) and 2) a significant genetic difference of one population sampled in the sympatric range (no.6) with all other populations (pairwise comparisons are provided in Table S2b). These patterns are summarized by PCAs (Fig.2 b, c) showing the separation of the Swedish populations (no.4a and 4b) along the first axis, of the population no.4a and no. 6 along the second axis, and of the population no.3 along the third axis. As for *C. robusta*, the best number of clusters explaining the overall genetic variance was two (Fig. 3b) with one cluster characterizing the individuals from populations no.4a and no.4b (83% of the individuals with a membership probability higher than 50%), and one cluster characterizing the individuals sampled in the populations sampled in the sympatric range (no. 5 to 12), the North American population (no.3) and one individual from population no.4a. With additional clusters retained (for improving the resolution of the assignment), 100% of the individuals of the NW Atlantic (no.3) were assigned to a third cluster (with $K = 3$, Fig. 3b) and 100% of the individuals of the population no.4a were assigned with a probability higher than 50% to a fourth cluster (with $K = 4$, Fig. 3b).

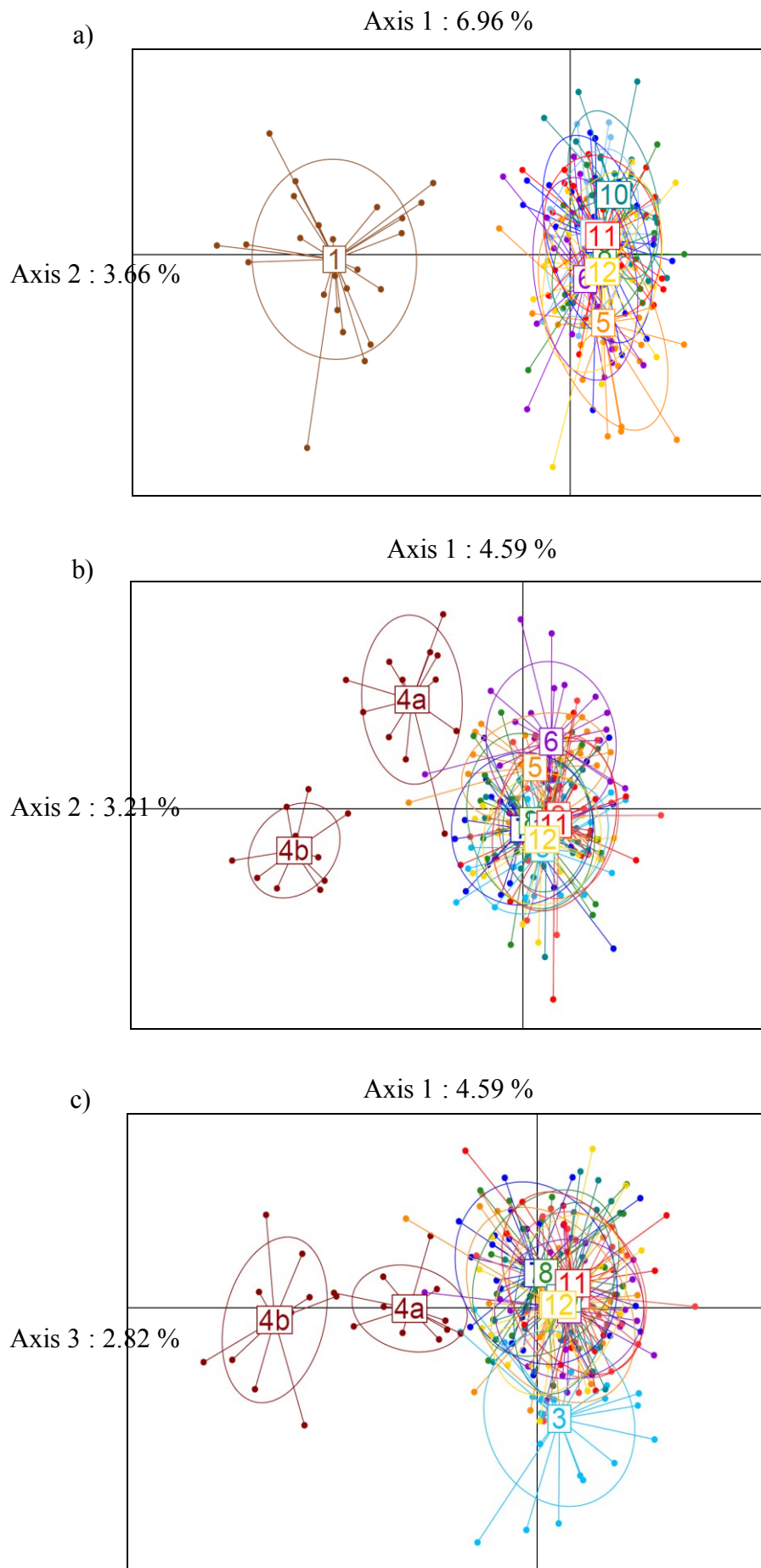
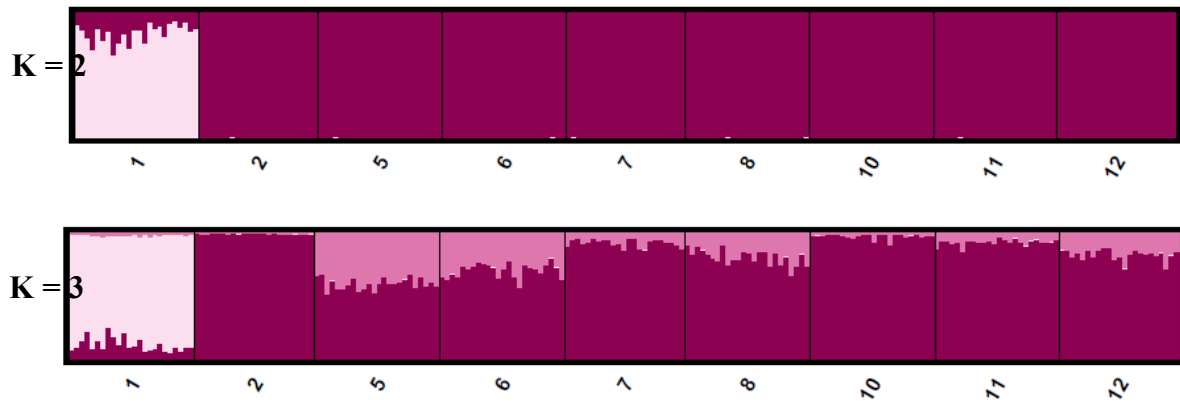


Figure 2. **Principal Components Analysis** among populations of *C. robusta* (a) and *C. intestinalis* (b, c)

a) *C. robusta*



b) *C. intestinalis*

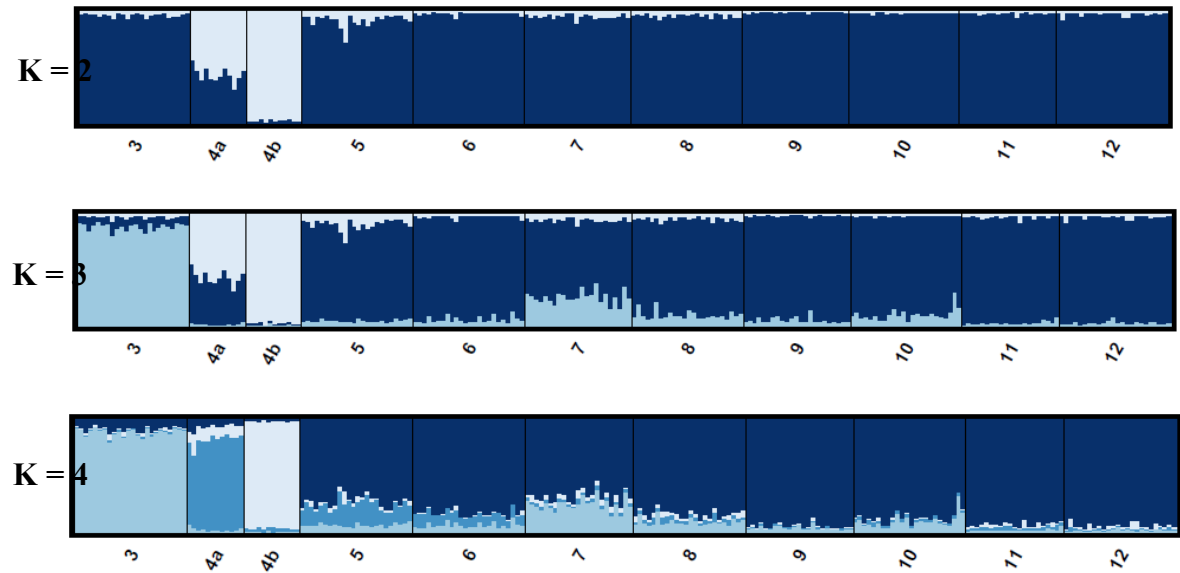


Figure 3. **Individual Bayesian assignment proportion** for *C. robusta* (a) and *C. intestinalis* (b) individuals using 115 and 166 polymorphic loci, respectively. Note that for both species, the most likely number of clusters K according to ΔK method of Evanno *et al.* (2005) was $K = 2$. Additional K highlighted the intraspecific clustering; to $K = 3$ for *C. robusta* and to $K = 4$ for *C. intestinalis*.

Low hybrid index disregarding the regional category and population status

A total of 115 loci showing a F_{ST} strictly superior to 0.8, were used to examine the patterns of shared polymorphism between the two species, and the likelihood of contemporary inter-specific gene flow vs. past introgression events. At the species level (i.e. across all individuals for each species), values of h were very low, with a value of 0.0066 for *C. robusta* and 0.0119 for *C. intestinalis*. h was however significantly higher for individuals of *C. intestinalis* than *C. robusta* (permutation test, $test.value = -7.522$, $P < 0.001$). Table 1 provides the estimates of the hybrid index (h) averaged across individuals, for each population of *C. robusta* and *C. intestinalis*.

At the population level, for *C. robusta*, h -values averaged across individuals ranged from 0.0023 for the allopatric population in the Mediterranean Sea (Etang de Thau, no.2) to 0.0181 for the allopatric population in the SE Pacific (Guanaqueros, no.1). Populations sampled in syntopic localities showed intermediate h -values, from 0.0047 (no.7) to 0.0067 (no.5). The difference of h

was significant between populations from syntopic and non-syntopic localities (test per permutation on h value of individuals, $test.value = 4.582$, $P < 0.001$) but this was mainly due to the large value of h in the non-syntopic population no.1, which was significantly higher than the other populations (pairwise comparison in Table S3a). For *C. intestinalis*, the average of h across individuals per population ranged from 0.0047 for the allopatric population of North Sea (Fiskebackskil – 20m depth, no.4b) to 0.0348 for the population of the syntopic locality no.11 (Camaret). A noticeable result was the presence of one individual in this latter population with an h value of 0.493. This individual was assigned with a probability of 1 to the 'F1 hybrid' category with NEWHYBRIDS. When removing this individual from the h estimation, the value in Camaret dropped to 0.0122, a value close to the average values for *C. intestinalis* individuals (i.e. 0.0119). It is noteworthy that all the other study individuals were assigned to their respective parental 'species' categories with NEWHYBRIDS (Table 1). Significantly lower values of h were found in populations of non-syntopic localities compared to populations of syntopic localities (permutation test, $test.value = -2.931$, $P = 0.006$), a result only explained by the value of h in population no.4b which was significantly lower than the others populations (test per permutation without no.4b, $test.value = -1.837$, $P = 0.061$, pairwise comparison in Table S3b). When analyzing syntopic localities, no significant correlation was observed for h between the populations of the two species sampled in these localities (Spearman's rank correlation, $r^2 = -0.595$, $P = 0.563$). To further examine the existence of backcrossed individuals, the relationship between h -value and the heterozygosity rate across the 115 study loci was plotted using a triangle plot displayed in figure 4: all except one individual displayed extreme h -values (close to 0 or 1) and an extremely low proportion of heterozygote loci for *C. robusta* and *C. intestinalis* alleles. The only exception is the individual sampled from Camaret (no.11) that was assigned by NEWHYBRIDS as a F1-hybrid: this showed both a high h -value and a high heterozygosity rate (i.e. 96.5%); these values were similar to the values observed for the two F1-hybrids experimentally produced in the laboratory (Fig. 4). Note that using all the markers available (i.e. 310 loci), the overall genetic variance was clearly distributed between the two study species (as defined based on morphological and mtDNA characteristics) with the putative wild F1-individual and the two experimentally produced F1 at an intermediate position as well-exemplified by the results of a PCA shown in figure 5.

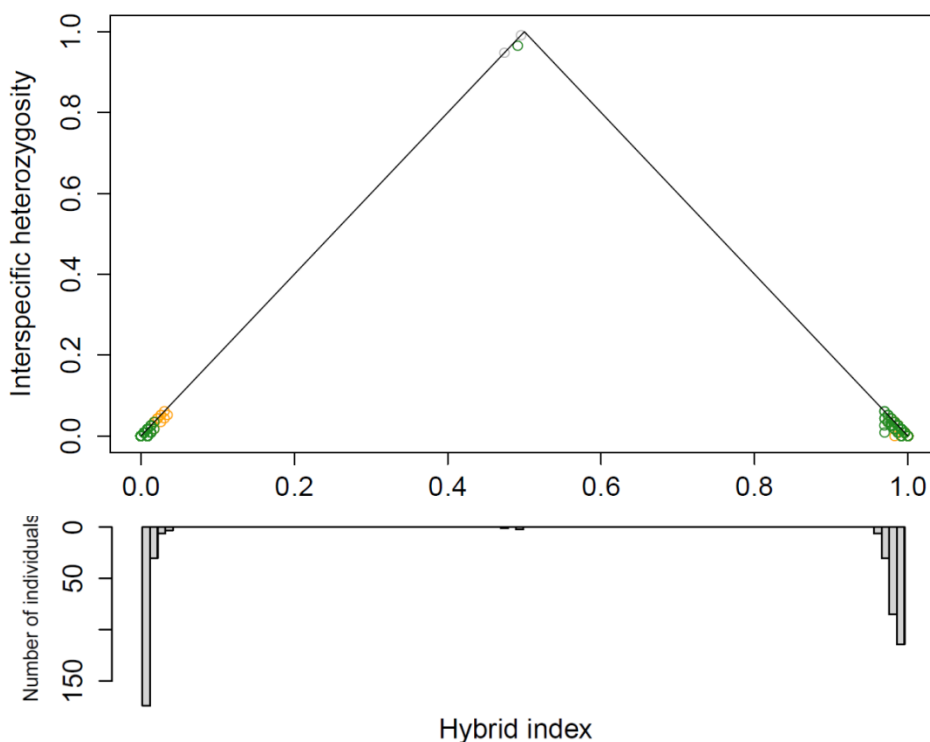


Figure 4. **Triangle plot showing the relationship between heterozygosity rate across loci and hybrid index for each individual.** Green and orange circles are individuals from syntopic and non-syntopic localities, respectively. At the top of the triangle, one green circle represents one individual from the locality no. 11 and the two gray circles are F1-hybrids from experimental crosses.

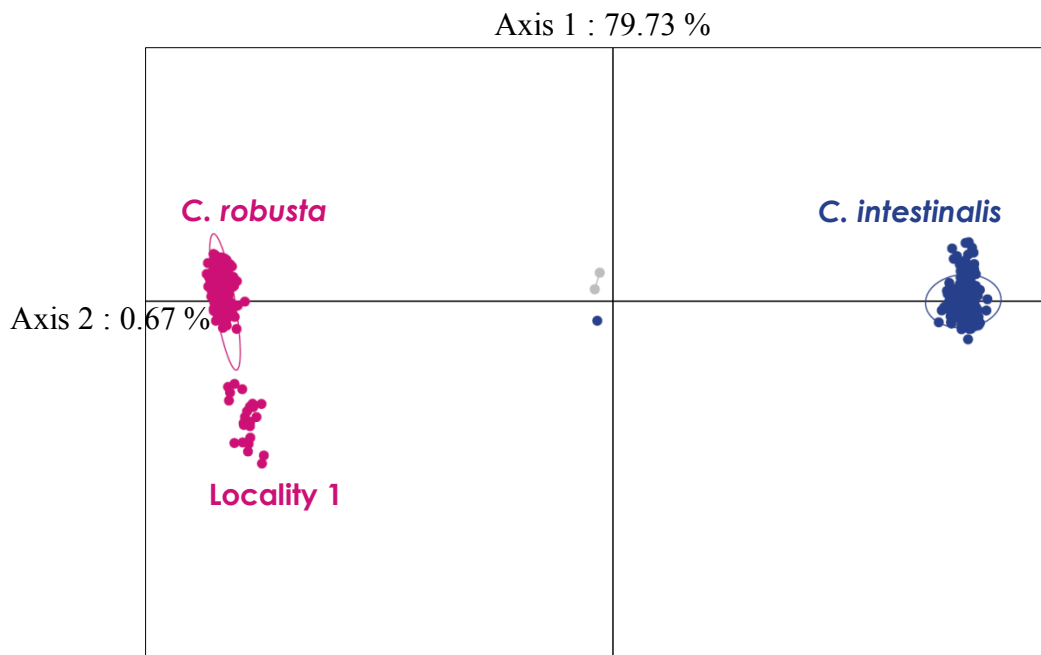


Figure 5. **Principal Components Analysis** using the all dataset (i.e. 310 SNPs, 449 individuals from natural populations and in grey two F1 hybrids from experimental crosses).

Heterogeneous admixture at the genome level for every population

Over the 115 loci used for admixture (inter-specific gene flow) analyses, 65 loci (56.5%) were differentially fixed between the two species (sf), 11 loci (9.6%) exhibited both specific alleles in *C. robusta* specimens, 34 (29.6%) showed admixture in *C. intestinalis* specimens and the remaining 5 loci (4.3%) showed admixture in specimens of the two species.

The extent of admixture varied along the genome across loci and individuals (Fig. 6a). For example, over the 8 admixed loci studied in chromosome number 1, admixture patterns were different between species, with two loci showing admixture in *C. robusta* only and 5 in *C. intestinalis* only whereas the eighth one showed admixed genotypes in the two species. Interestingly this latter locus was located in one of the introgression hotspot identified by Roux *et al.* (2013). The same pattern was also observed on chromosome number 2: among the 9 study loci on this chromosome, only one showed admixture in *C. robusta* specimens whereas the eight others showed admixture in *C. intestinalis* specimens only (six being located in an introgression hotspot).

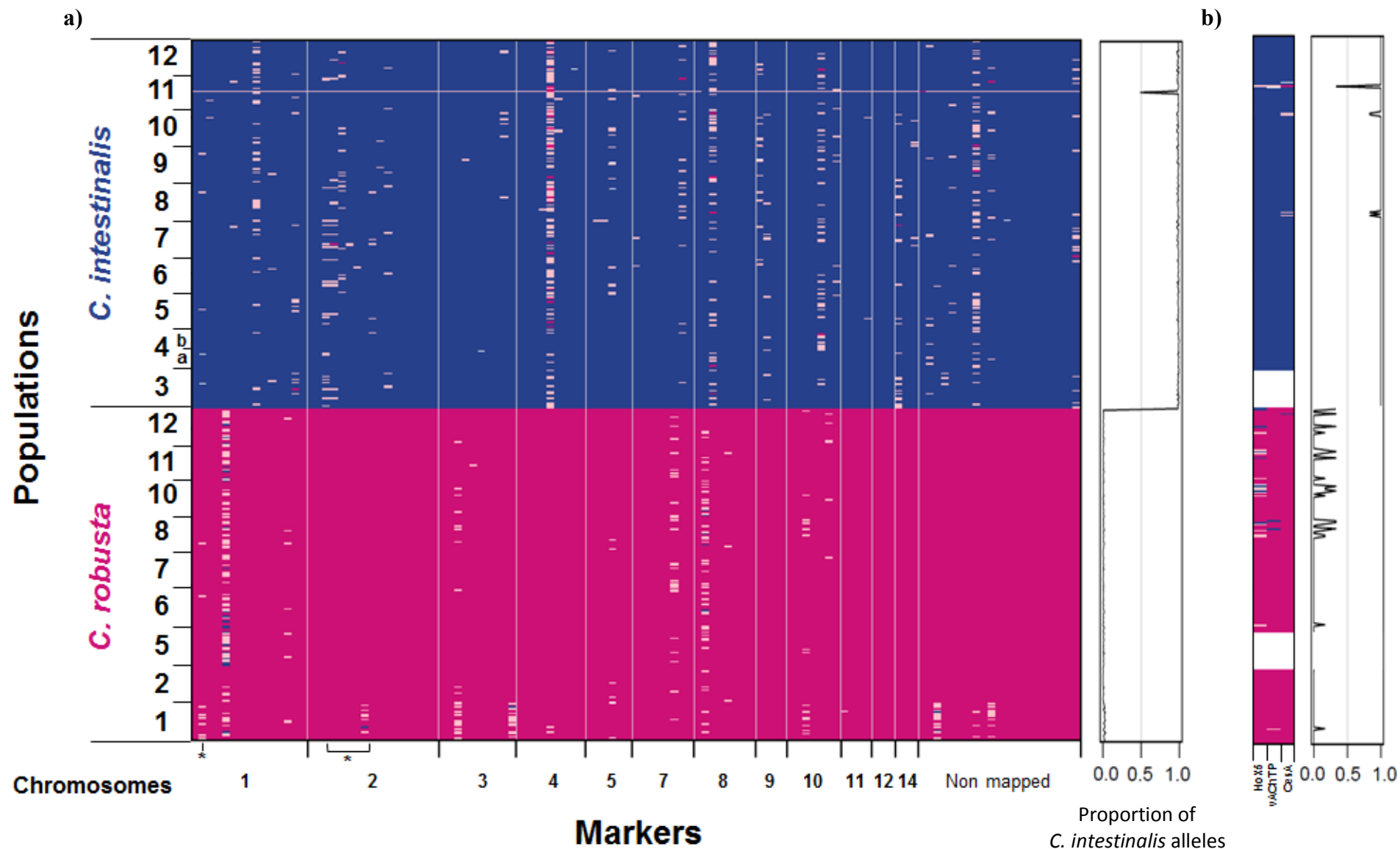


Figure 6. **a) Genomic architecture using 115 loci selected for inter-specific analyses.** Markers (x-axis) are ordered following physical position on chromosomes. Individuals (y-axis) are ordered per population. Dark pink cases indicate homozygote genotype on *C. robusta* alleles; dark blue, homozygote genotype on *C. intestinalis* alleles; light pink, heterozygotes for *C. robusta* and *C. intestinalis* alleles. Asterisks indicate loci located in introgression hotspots defined by Roux *et al.* (2013). **b) Pattern of admixture for 3 nuclear loci (Hox5, vAChTP, CesA) analyzed by PCR and PCR-RFLP,** already used in previous studies (Nydam & Harrison 2011; Sato *et al.* 2014; Bouchemousse *et al.* 2015). Note that for two populations (no. 5 for *C. robusta* and no.3 for *C. intestinalis*), genotypic data for these three loci are missing.

Admixture patterns were also informative regarding the syntopic and non-syntopic status of the study populations. Details of allele frequencies at each locus in the allopatric and sympatric ranges of the two species are provided in Table S4. The loci showing similar patterns among population categories are summarized with a Venn diagram in Figure 7. When comparing populations for *C. robusta*, the admixture profile appeared to be remarkably stable across populations although with a noticeable exception for the SE Pacific population (no.1 in Fig. 6a). The highest number of admixed loci (13 of the 16 loci showing admixture in *C. robusta*) was observed in the SE Pacific allopatric population. Out of the 4 loci showing shared polymorphism in the two species, three were also specific of the SE Pacific population. The two allopatric populations (no.1 and 2) shared a limited number of admixed loci but interestingly populations from allopatric and sympatric ranges share a substantial number of admixed loci (7 over the two allopatric sites and all with the allopatric populations from the Mediterranean Sea). The lack of differences in the overall admixture pattern between the allopatric and sympatric regions also holds for *C. intestinalis*. Over all *C. intestinalis* specimens, 39 loci showed admixture with 16 found in both sympatric and allopatric regions. Two admixed loci were also shared by every population and two between the three allopatric populations (i.e. no.3, no.4a and 4b). Although the highest number of admixed loci (38 of the 39 loci) was observed in the sympatric region, a substantial number of admixed loci was found in allopatric populations (17): this lower number is likely explained by a lower sampling coverage of the allopatric range. It is also noteworthy that *C. intestinalis* specimens sampled in Aber Wrac'h (no. 9), located in the sympatric range but not in syntopy with *C. robusta*, displayed admixture patterns similar to syntopic populations found in the same region, i.e. the English Channel (Fig. 6a). Altogether, the results observed thus pointed out heterogeneous levels of introgression along the genome with admixture observed in both syntopic and non-syntopic sites.

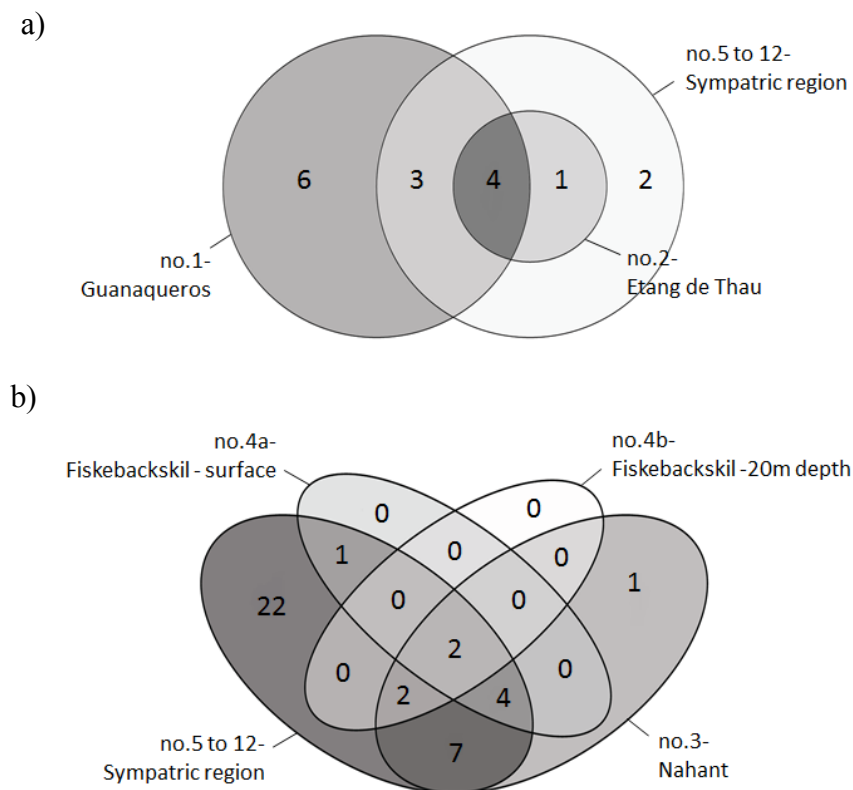


Figure 7. Venn diagrams showing the number and distribution of loci with shared polymorphism in allopatric vs. sympatric populations over the 115 SNPs selected for interspecific gene flow analyses, for *Ciona robusta* (a) and *C. intestinalis* (b) individuals.

Discussion

In this study, which is the first population genomics study performed in ascidian species, we used 310 SNPs 1) to compare the genetic diversity and structure of the two inter-fertile *Ciona* species living in sympatry in the Northeastern Atlantic, 2) to clarify the previous hypothesis of contemporary hybridization versus past introgression between the two species (Nydam & Harrison 2011; Bouchemousse *et al.* 2015) and 3) to analyze the introgression patterns within allopatric and sympatric ranges of the two species. These three points are discussed in turn below.

Contrasting nuclear genetic diversity between the native and the non-native species in their distribution range

At a global scale and in the range of sympatry (i.e. English Channel and south Brittany), based on the 239 shared loci (Table 3), *C. intestinalis* displayed significantly higher genetic diversity than *C. robusta*, confirming the diversity pattern observed by Roux *et al.* (2013) using full-transcriptomic data and by Bouchemousse *et al.* (submitted) using mtDNA at a global scale.

In the sympatric range, significant genetic variance among populations of *C. robusta* was observed (Table 4). This pattern, not explained by isolation by distance between populations (Mantel test with GENEPOP on the web: $r^2 = -0.501$, $P = 0.537$), is likely due to repeated introductions of *C. robusta* specimens from multiples origins. This hypothesis is well supported by individual Bayesian assignments (Fig. 4a) with individuals from the N. Atlantic introduction (sympatric) range assigned to two different clusters (especially for individuals sampled in UK). Such intra-specific mixture or admixture patterns are commonly observed in non-indigenous marine species (e.g. in ascidians; Bock *et al.* 2012; Ordonez *et al.* 2013) due to repeated introductions from multiple and diverse origins because of poorly controlled vectors of introduction (Molnar *et al.* 2008). At a global scale, both the strong genetic differentiation (Table 4; Fig. 3a) and the higher genetic diversity observed in the population of SE Pacific (Table 3) suggest an independent and older introduction history as compared to the European populations, confirming previous insights from mitochondrial data (Bouchemousse *et al.* submitted). In the population of SE Pacific, we also observed one locus showing an atypical behavior in terms of genetic differentiation, i.e. an outlier (Fig. S3). Selection from standing genetic variation following introductions has sometimes, although rarely, been documented in introduced species (Facon *et al.* 2006; Rius & Darling 2014). Such a process has also been suggested as a plausible explanation for outliers observed in the marine introduced oyster *Crassostrea gigas* in Europe, here an outcome of positive selection in fjord-like environments (Rohfritsch *et al.* 2013). Similar processes may have contributed to the emergence of local adaptation in the site sampled in Chile. However, with only one population analysed in this region and in the absence of population samples from the native range (i.e. NW Pacific) in our study, we cannot further test for a signature of positive selection following introduction.

For *C. intestinalis*, populations of the sympatric range exhibit a higher genetic diversity compared to *C. robusta* but they were not genetically different between them (Table 4) which suggests a high connectivity associated with high effective size of populations in this region. Recreational sailing, which is an important activity in the study area, may have promoted human-mediated transport of *C. intestinalis* (a fouling organism) for a long time, and thus gene flow over a regional scale. At a larger scale, in the native range (i.e. NE Atlantic), populations of North Sea were however strongly differentiated from populations of the English Channel (Table S2b); a genetic structure not be explained by isolation by distance between populations (Mantel test without no.3: $r^2 = 0.683$, $P = 0.002$). The population from the NW Atlantic (Nahant no. 3) exhibited a lower genetic differentiation with populations of the English Channel than with populations of North Sea, a pattern already observed with mtDNA (data not shown). North Sea populations also displayed a signature of positive selection at several loci (snp204 and snp70, Fig. S4). Our data also provided evidence of reduced gene flow between the two sub-localities sampled in North Sea,

one in shallow water (no.4a) and one at 20-meters depth (no.4b). To our knowledge, no published data report contrasted genetic features between local shallow and deep populations of *C. intestinalis*. However, such pattern is reported in the doctoral thesis summary by Elin Renborg (<https://gupea.ub.gu.se/handle/2077/35128?locale=sv>). It is also noteworthy that similar patterns have already been documented in other coastal marine species showing extended distribution along depth gradients (Jennings *et al.* 2013; Pivotto *et al.* 2015). The signature of positive selection found in population no.4b at snp70 may suggest local adaptation to deep environment (i.e. as a response to low light conditions or decreased temperature and thermal variation). Adaptations to local conditions have already been suggested in native range of emblematic marine invaders at global scale (e.g. thermal tolerance in *Carcinus maenas*; Tepolt & Palumbi 2015). However, we cannot exclude that the outlier locus is associated with genetic incompatibilities which restrict gene flow at the fraction of the genome where the locus is located (Bierne *et al.* 2011). This is for instance the most likely explanation of the outliers found in the mollusk *Crepidula fornicata* in its native range (Riquet *et al.* 2013). More populations from deep and shallow environments in different regions need to be studied, in addition to experimental approaches, to further examine the hypothesis of local adaptation to depth in *C. intestinalis*.

Another noticeable result is the absence of departure from Hardy Weinberg Equilibrium (HWE) in all populations studied whatever the species. This finding differed from several published studies of *C. robusta* and *C. intestinalis* based on microsatellite loci. Heterozygote deficiencies have indeed been regularly reported (Caputi *et al.* 2007; Sordino *et al.* 2008; Zhan *et al.* 2010; Zhan *et al.* 2012; Affinito *et al.* 2014). This discrepancy can be explained by the choice of marker used (microsatellite versus SNPs); null alleles are a known pitfall of microsatellite loci (Dakin & Avise 2004; Chapuis & Estoup 2007). With the high divergence between the two *Ciona* species (i.e. 14% of substitutions per synonymous site based on transcriptomic data of the two species; Roux *et al.* 2013) and a substantial amount of past introgression between the two species (Roux *et al.* 2013, this study), the presence of null alleles is likely to be important because of a low conservation of the microsatellite regions between the two species. By using bi-allelic markers chosen to avoid genotyping failure, SNPs appear more reliable markers to avoid bias due to null alleles (i.e. departure of HWE, reduction of genetic diversity within populations, estimation of population differentiation, see for a review Chapuis & Estoup (2007)) and thus to study genetic diversity and structure at once in the two *Ciona* species, as demonstrated for several other taxa (Liu *et al.* 2005; Haasl & Payseur 2011; Dufresne *et al.* 2014).

Absence of interspecific gene flow in the contemporary sympatric range

In previous studies that examined interspecific gene flow in the sympatric range, very low admixture rates have been observed (i.e. 4.2% and one putative F1-hybrid over 730 individuals (Nydam & Harrison 2011); 6.3% over 288 individuals sampled in the same locality (Sato *et al.* 2014); 4.3% and one putative F1 hybrid over ca. 3,000 individuals (Bouchemousse *et al.* 2015)), suggesting, according to these authors, a lack of effective reproduction between the two species in syntopic localities. However, these authors used only few (supposedly) species-diagnostic nuclear markers (between 3 and 6 loci according to the study). Consequently, discriminating the footprint left by historical introgression or contemporary hybridization was particularly difficult (Nydam & Harrison 2011; Bouchemousse *et al.* 2015). Using 115 loci and over the 449 individuals studied, only one individual, found in the syntopic population of Camaret (no.11), had a multi-locus genotype expected for a F1-hybrid. This result was supported by both NEWHYBRIDS and INTROGRESS analyses (Table 1, Fig. 4 and 6a). The mtDNA type of this individual is typical of *C. intestinalis* and in many studies (Suzuki *et al.* 2005; Bouchemousse *et al.* 2015), F1 hybrids produced in laboratory experiments are obtained in one direction only, which is the one corresponding to crosses involving oocytes of *C. intestinalis* and sperm of *C. robusta* (ca. 80% of fertilization rate against < 6% in the opposite direction, Bouchemousse *et al.* 2015). The presence of only one F1 hybrid only in our study confirms the hypothesis by Sato *et al.* (2014) and Bouchemousse *et al.* (2015) of the existence of strong pre zygotic isolation mechanisms preventing contemporary

hybridization in the wild. It is noteworthy that the h -value is not equal to 0.5 and that the proportion of heterozygote loci is not 100%, as should have been theoretically expected in F1-hybrids. But as shown in Fig. 4, this was also the case for the two experimental F1 hybrids. This pattern is likely explained by the fact that some of the loci have been historically introgressed (see next section) and that the parents were either heterozygotes for *C. intestinalis* and *C. robusta* alleles or homozygotes for the alternative genomic background. We also observed non-null h values in non-syntopic populations (Table 1 and pairwise comparison in Table S3). In addition, NEWHYBRIDS and INTROGRESS analyses did not identify any individuals derived from recent interspecific gene flow (i.e. F2 hybrids and backcrosses with parental lineage). Altogether these results confirm that no contemporary gene flow is occurring between the two species. The presence of F1 hybrids only is compatible with recessive Dobzhansky-Muller incompatibilities (Turelli & Orr 2000) which are expressed by recessive mutations in subsequent generations of hybridization (e.g. Fishman & Willis 2001; Bierne *et al.* 2006; and for a review, Maheshwari & Barbash 2011). This hypothesis proposed by Roux *et al.* (2013) fits well with our data pointing out the absence of backcrossed individuals.

Admixture observed result from past introgression between the two species

Hybrid index values were very low but never null whatever the region (sympatric or allopatric) and locality status (syntopic vs. non-syntopic, Table 1). Indeed, admixture is observed in all populations including in localities of allopatric regions (for *C. robusta*: SE Pacific and Mediterranean Sea, and for *C. intestinalis*: North Sea and NW Atlantic, Fig. 4a). With one exception in SE Pacific (see below), the admixture profile is also remarkably stable across populations sampled.

Shared polymorphisms observed between two species may result from 1) incomplete lineage sorting of ancestral polymorphism, 2) past inter specific gene flow (past introgressive hybridization) or 3) contemporary hybridization events. In the case of the two *Ciona* species studied here, the third explanation can be reasonably excluded as discussed above. Concerning incomplete lineage sorting of ancestral polymorphism, it would have meant that the polymorphism observed nowadays would have been maintained randomly across loci after the allopatric divergence estimated to have occurred during the Pliocene (between 2.59 and 5.33 My; Roux *et al.* 2013). Considering the long time elapsed since the divergence, the probability of occurrence of the two ancestral alleles in both daughter species is likely to be extremely low under a neutral model (Pamilo & Nei 1988). However, high effective population sizes moderates the effect of genetic drift and so the probability of fixation of alleles over the time (Pamilo & Nei 1988; Maddison 1997). *Ciona* species and their common ancestor were characterized by high effective population sizes, estimated in Roux *et al.* (2013), as between 115,000 and 395,000 for *C. robusta*, 748,000 - 1,022,000 for *C. intestinalis* and 1,606,000 - 2,220,000 for the common ancestor. We thus cannot exclude that for the few loci showing moderate values of the frequencies of minor alleles and shared polymorphism in most populations (as snp150, Table S4), the admixture observed is a feature of ancestral polymorphism. However for the vast majority of the loci used as species-diagnostic (or sub-diagnostic) loci (i.e. loci with F_{st} value higher than 0.80), it is more likely that the observed admixture is the footprint of past introgressive hybridization that occurred during the secondary contact described by Roux *et al.* (2013) and estimated to have occurred 15,500 years ago (95% CI: 4,300 - 56,800). Following this secondary contact, Roux *et al.* (2013) estimated that ca. 20% crossed the species barrier in both directions. Besides similarities in admixture patterns across localities, the hypothesis of an ancient admixture event is also supported by the presence of admixed loci in introgression hotspots (i.e. loci pointed by an asterisk in Fig. 7a) in which are ca. 11% of the loci showing evidence of interspecific migration in the study by Roux *et al.* (2013). At a genome scale, variations of the extent of admixture across loci over 449 individuals confirm the genome-wide heterogeneity of introgression rate observed by Roux *et al.* (2013) on a much smaller set of individuals.

Our finding is also interesting to consider in light of previous studies (e.g. Nydam & Harrison 2011; Sato *et al.* 2014; Bouchemousse *et al.* 2015) which used a small set of putative diagnostic

markers to examine contemporary interspecific gene flow. Our results indeed cast doubts about the status of these markers and their ability to reliably distinguish the two species. To better investigate the properties of these markers, we genotyped most of the individuals of the present study (all except individuals of populations no. 5 for *C. robusta* and no. 3 for *C. intestinalis*) using three of these putative diagnostic loci; namely Hox5 (Caputi *et al.* 2007), vAChTP and CesA (Nydham & Harrison 2007, 2010). We used these three loci in a previous study (Bouchemousse *et al.* 2015). As expected from the results of this study, the three markers were not heterozygotes in the experimentally produced F1 hybrids, which should have been the case if they are species-diagnostic markers. Concerning the natural populations, patterns of admixture are displayed in Fig. 6b and showed inconsistent patterns as compared to expectations. For instance, CesA showed a homozygote genotype with two *C. robusta* alleles in the single F1 individual otherwise identified with the complete set of SNPs. They also revealed admixture in one allopatric locality (i.e. in SE Pacific on vAChTP). Altogether the three nuclear markers are not strictly speaking "species diagnostic markers" and may falsely identify backcrossed individuals. Note however that their introgression rate, using all individuals successfully genotyped, is low: minor allele frequencies observed for Hox5, vAChTP and CesA are 0.2, 0.2 and 1.4% for *C. intestinalis*, and 7.2, 1.3 and 0.5% for *C. robusta*, respectively. This explains why in experimental crosses they often appear as diagnostic markers (S. Bouchemousse, G. Dubois and F. Viard, unpublished data).

The admixture pattern is also asymmetrical across loci: for Hox5, most of the admixture is observed in individuals that are morphologically and maternally (mtDNA) assigned to *C. robusta*. And yet, laboratory experiments showed that inter-specific crosses are mostly successful in the opposite direction only. It is thus likely to be a locus in which alleles were ancestrally transferred from *C. intestinalis* to *C. robusta*. The opposite pattern and introgression direction characterized the two other loci. These results highlight the risks of using putative species-diagnostic markers without preliminary knowledge about the likelihood of past introgression between two study taxa. The species complex of *Mytilus* species is another well-known case study: *Glu* and *mac-1* loci were mistakenly considered as diagnostic makers for *M. galloprovincialis* and *M. edulis* at a global scale (Borsa *et al.* 2007; Borsa *et al.* 2012), but were later shown to have been historically introgressed during secondary contact(s) caused by glacial oscillations (Roux *et al.* 2014).

Interaction between range shift and human-mediated introductions

Admixture profiles were remarkably stable across populations of allopatric and sympatric ranges (except for the population of SE Pacific). This widespread interspecific admixture suggest that range expansion of the two species, through both natural range shifts (with long-term environmental changes) and/or human-mediated introductions, occurred after a primary episode of secondary contact between the two taxa, during which interspecific gene flow occurred. One population however displayed a distinctive pattern: the single population sampled in the SE Pacific. This *C. robusta* population showed the highest number of loci with polymorphism shared with *C. intestinalis* and the highest *h*-values over all *C. robusta* populations. Shared polymorphism between the SE Pacific *C. robusta* population and populations of *C. intestinalis* could result from 1) incomplete lineage sorting of ancestral polymorphism, 2) molecular convergence or 3) adaptive introgression (Hedrick 2013). Considering the time elapse since the divergence (as explained above), the first hypothesis on incomplete lineage sorting of ancestral polymorphism is unlikely. Molecular convergence have been documented between closed or distant related taxa (e.g. O'HUigin *et al.* 2002; and for a review, Wood *et al.* 2005) but for *C. intestinalis* and *C. robusta* for which mutation rate has been estimated at 10^{-8} per base pairs per year (Tsagkogeorga *et al.* 2012), this hypothesis is highly unlikely considering the short time elapsed since their historical secondary contact (i.e. between 4,300 and 56,800 yrs.). Adaptive introgression following secondary contact, a process documented in several recent studies (Mendez *et al.* 2012; Pardo-Diaz *et al.* 2012; Fontaine *et al.* 2015), is thus the most likely hypothesis to consider. In the SE Pacific, several loci exhibited atypical higher frequency of *C. intestinalis* alleles compared to other populations (SNPs in bold in Table S4). None of these loci matches with genes coding for a known

phenotypic or physiological trait (Table S4). The date for the first report of *C. robusta* along the Chilean coasts is 1885 (Traustedt (1885) cited in Castilla *et al.* (2005)). We thus cannot exclude that adaptive introgression have occurred in the source population(s) of the populations introduced in Chile rather than after the introduction (as an outcome of selection in the Chilean introduction range). Further investigations are needed, using for instance modelling methods such as those performed by Fraisse *et al.* (2014) to examine the likelihood of introgressive adaptation in a *Mytilus* sp. hybrid zone. A much larger number of populations representative of the global distribution of *C. robusta* is also needed to investigate the processes that occurred in the SE Pacific as compared to the other regions where *C. robusta* is nowadays distributed.

In conclusion, our study confirmed the almost complete absence of contemporary gene flow in the human-mediated contact zone wherein *C. robusta* and *C. intestinalis* co-exist in syntopy. Because efficient barriers prevent hybridization in the wild, the evolution of the non-native species through adaptive introgression, following the transfer of *C. intestinalis* alleles in its genome, is unlikely. Our study also provides evidence that the genetic admixture observed is the outcome of historical interspecific gene flow redistributed at a global scale by natural range shifts and human-mediated introductions. Atypical introgression patterns were observed in the population sampled in the SE Pacific. This result paves the way for further work to investigate introgressive adaptation processes in other regions, in light of the range shift history of *C. robusta*.

Acknowledgment

The authors are very grateful to C. Roux and N. Galtier for making available RNA sequences from the Pophyl Project, K. Belkhir for his precious help to the optimization of loci selection and the ADN^{id} society (Montpellier) for the genotyping of SNPs. We are also grateful to all our colleges who contributed to the collection of samples: the divers of the Marine Operations department (*Service Mer & Observation*) at the Roscoff Biological Station, J.D.D. Bishop, S. Krueger-Hadfield, C.A. Wood, B. Lundve and J. Pechenik. The authors kindly acknowledge C. Roux and C. Fraisse for help and advices on R packages and scripts. This work benefitted from funding of the ANR project HYSEA (no. ANR-12-BSV7-0011) and the Interreg IVa Marinexus project.

References

- Abbott R, Albach D, Ansell S, *et al.* (2013) Hybridization and speciation. *Journal of Evolutionary Biology* **26**, 229-246.
- Affinito O, Andreakis N, Caputi L, *et al.* (2014) High connectivity and directional gene flow in European Atlantic and Mediterranean populations of *Ciona intestinalis* sp. A. *Marine Ecology*, 1-14, doi: 10.1111/maec.12226 **in press**
- Allendorf FW, Leary RF, Spruell P, Wenburg JK (2001) The problems with hybrids: setting conservation guidelines. *Trends in Ecology & Evolution* **16**, 613-622.
- Anderson EC, Thompson EA (2002) A model-based method for identifying species hybrids using multilocus genetic data. *Genetics* **160**, 1217-1229.
- Barton N (1979) Dynamics of hybrid zones. *Heredity* **43**, 341-359.
- Belkhir K, Borsa P, Goudet J, *et al.* (2004) *Genetix 4.05*, logiciel sous Windows™ pour la génétique des populations. Laboratoire Génome, Populations, Interactions, CNRS UMR 5171, Université de Montpellier II, Montpellier (France).
- Bierne N, Bonhomme F, Boudry P, Szulkin M, David P (2006) Fitness landscapes support the dominance theory of post-zygotic isolation in the mussels *Mytilus edulis* and *M. galloprovincialis*. *Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences* **273**, 1253-1260.
- Bierne N, Welch J, Loire E, Bonhomme F, David P (2011) The coupling hypothesis: why genome scans may fail to map local adaptation genes. *Molecular Ecology* **20**, 2044-2072.
- Bock DG, MacIsaac HJ, Cristescu ME (2012) Multilocus genetic analyses differentiate between widespread and spatially restricted cryptic species in a model ascidian. *Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences* **279**, 2377-2385.
- Borsa P, Daguin C, Bierne N (2007) Genomic reticulation indicates mixed ancestry in Southern-Hemisphere *Mytilus* spp. mussels. *Biological Journal of the Linnean Society* **92**, 747-754.
- Borsa P, Rolland V, Daguin-Thiebaut C (2012) Genetics and taxonomy of Chilean smooth-shelled mussels, *Mytilus* spp. (Bivalvia: Mytilidae). *Comptes Rendus Biologies* **335**, 51-61.
- Bouchemousse S, Lévêque L, Dubois G, Viard F (2015) Co-occurrence and reproductive synchrony do not ensure hybridization between an alien tunicate and its interfertile native congener. *Evolutionary Ecology*, 1-19, doi: 10.1007/s10682-015-9788-1 **in press**
- Brunetti R, Gissi C, Pennati R, *et al.* (2015) Morphological evidence that the molecularly determined *Ciona intestinalis* type A and type B are different species: *Ciona robusta* and *Ciona intestinalis*. *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research* **53**, 186-193.
- Caputi L, Andreakis N, Mastroiuto F, *et al.* (2007) Cryptic speciation in a model invertebrate chordate. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104**, 9364-9369.
- Castilla JC, Uribe M, Bahamonde N, *et al.* (2005) Down under the southeastern Pacific: marine non-indigenous species in Chile. *Biological Invasions* **7**, 213-232.
- Chapuis MP, Estoup A (2007) Microsatellite null alleles and estimation of population differentiation. *Molecular Biology and Evolution* **24**, 621-631.
- Curat M, Ruedi M, Petit RJ, Excoffier L (2008) The hidden side of invasions: massive introgression by local genes. *Evolution* **62**, 1908-1920.
- Dakin EE, Avise JC (2004) Microsatellite null alleles in parentage analysis. *Heredity* **93**, 504-509.
- Dehal P, Satou Y, Campbell RK, *et al.* (2002) The draft genome of *Ciona intestinalis*: insights into chordate and vertebrate origins. *Science* **298**, 2157-2167.
- Dufresne F, Stift M, Vergilino R, Mable BK (2014) Recent progress and challenges in population genetics of polyploid organisms: an overview of current state-of-the-art molecular and statistical tools. *Molecular Ecology* **23**, 40-69.
- Earl D, vonHoldt B (2011) STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. *Conservation Genetics Resources* **4**, 359-361.
- Elton CS (1958) The ecology of invasions by animals and plants. Methuen publ. Reprinted 2000 by University of Chicago Press
- Evanno G, Regnaut S, Goudet J (2005) Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Molecular Ecology* **14**, 2611-2620.

- Facon B, Genton BJ, Shykoff J, *et al.* (2006) A general eco-evolutionary framework for understanding bioinvasions. *Trends in Ecology & Evolution* **21**, 130-135.
- Fishman L, Willis JH (2001) Evidence for Dobzhansky-Muller incompatibilities contributing to the sterility of hybrids between *Mimulus guttatus* and *M.nasutus*. *Evolution* **55**, 1932-1942.
- Fitzpatrick BM, Johnson JR, Kump DK, *et al.* (2010) Rapid spread of invasive genes into a threatened native species. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **107**, 3606-3610.
- Foll M, Gaggiotti O (2008) A genome-scan method to identify selected loci appropriate for both dominant and codominant markers: a bayesian perspective. *Genetics* **180**, 977-993.
- Fontaine MC, Pease JB, Steele A, *et al.* (2015) Extensive introgression in a malaria vector species complex revealed by phylogenomics. *Science* **347**, 1258524.
- Fraisse C, Belkhir K, Welch J, Bierne N (2015) Local interspecies introgression is the main cause of extreme levels of intraspecific differentiation in mussels. *Molecular Ecology*, 1-18, doi: 10.1111/mec.13299 **in press**
- Fraisse C, Roux C, Welch JJ, Bierne N (2014) Gene-flow in a mosaic hybrid zone: is local introgression adaptive? *Genetics* **197**, 939-951.
- Gompert Z, Buerkle CA (2010) INTROGRESS: a software package for mapping components of isolation in hybrids. *Molecular Ecology Resources* **10**, 378-384.
- Haas RJ, Payseur BA (2011) Multi-locus inference of population structure: a comparison between single nucleotide polymorphisms and microsatellites. *Heredity* **106**, 158-171.
- Harrison RG, Larson EL (2014) Hybridization, introgression, and the nature of species boundaries. *Journal of Heredity* **105**, 795-809.
- Hedrick PW (2013) Adaptive introgression in animals: examples and comparison to new mutation and standing variation as sources of adaptive variation. *Molecular Ecology* **22**, 4606-4618.
- Hewitt GM (1988) Hybrid zones: natural laboratories for evolutionary studies. *Trends in Ecology & Evolution* **3**, 158-167.
- Hewitt GM (2004) Genetic consequences of climatic oscillations in the Quaternary. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* **359**, 183-195.
- Hothorn T, Hornik K, van de Wiel MA, Zeileis A (2008) Implementing a class of permutation tests: The *coin* package. *Journal of Statistical Software* **28**, 1-23.
- Hubisz MJ, Falush D, Stephens M, Pritchard JK (2009) Inferring weak population structure with the assistance of sample group information. *Molecular Ecology Resources* **9**, 1322-1332.
- Jakobsson M, Rosenberg NA (2007) CLUMPP: a cluster matching and permutation program for dealing with label switching and multimodality in analysis of population structure. *Bioinformatics* **23**, 1801-1806.
- Jennings RM, Etter RJ, Ficarra L (2013) Population differentiation and species formation in the deep sea: the potential role of environmental gradients and depth. *Plos One* **8**, e77594.
- Jombart T, Ahmed I (2011) Adegenet 1.3-1: new tools for the analysis of genome-wide SNP data. *Bioinformatics* **27**, 3070-3071.
- Liu NJ, Chen L, Wang S, Oh CG, Zhao HY (2005) Comparison of single-nucleotide polymorphisms and microsatellites in inference of population structure. *Bmc Genetics* **6**, S26.
- Maddison WP (1997) Gene trees in species trees. *Systematic Biology* **46**, 523-536.
- Maggs CA, Castilho R, Foltz D, *et al.* (2008) Evaluating signatures of glacial refugia for North Atlantic benthic marine taxa. *Ecology* **89**, S108-S122.
- Maheshwari S, Barbash DA (2011) The genetics of hybrid incompatibilities. In: *Annual Review Genetics*, Vol 45 (eds. Bassler BL, Lichten M, Schupbach G), pp. 331-355.
- Mendez FL, Watkins JC, Hammer MF (2012) A haplotype at STAT2 introgressed from Neanderthals and serves as a candidate of positive selection in Papua New Guinea. *American Journal of Human Genetics* **91**, 265-274.
- Molnar JL, Gamboa RL, Revenga C, Spalding MD (2008) Assessing the global threat of invasive species to marine biodiversity. *Frontiers in Ecology and the Environment* **6**, 485-492.
- Nydam ML, Harrison RG (2007) Genealogical relationships within and among shallow-water *Ciona* species (Asciacea). *Marine Biology* **151**, 1839-1847.
- Nydam ML, Harrison RG (2010) Polymorphism and divergence within the ascidian genus *Ciona*. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **56**, 718-726.

- Nydam ML, Harrison RG (2011) Introgression despite substantial divergence in a broadcast spawning marine invertebrate. *Evolution* **65**, 429-442.
- O'Huigin C, Satta Y, Takahata N, Klein J (2002) Contribution of homoplasy and of ancestral polymorphism to the evolution of genes in anthropoid primates. *Molecular Biology and Evolution* **19**, 1501-1513.
- Ordóñez V, Pascual M, Rius M, Turon X (2013) Mixed but not admixed: a spatial analysis of genetic variation of an invasive ascidian on natural and artificial substrates. *Marine Biology* **160**, 1645-1660.
- Orr MR, Smith TB (1998) Ecology and speciation. *Trends in Ecology & Evolution* **13**, 502-506.
- Pamilo P, Nei M (1988) Relationships between gene trees and species trees. *Molecular Biology and Evolution* **5**, 568-583.
- Pardo-Díaz C, Salazar C, Baxter SW, et al. (2012) Adaptive introgression across species boundaries in *Heliconius* butterflies. *Plos Genetics* **8**, e1002752.
- Pivotto ID, Nerini D, Masmoudi M, et al. (2015) Highly contrasted responses of Mediterranean octocorals to climate change along a depth gradient. *Royal Society open science* **2**, 140493-140493.
- Pritchard JK, Stephens M, Donnelly P (2000) Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* **155**, 945-959.
- Procaccini G, Affinito O, Toscano F, Sordino P (2011) A new animal model for merging ecology and evolution. In: *Evolutionary biology: concepts, biodiversity, macroevolution and genome evolution* (ed. Pontarotti G), pp. 91-106, Springer Verlag, Berlin.
- R Development Core Team (2005) R: a language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical, Vienna, Austria ISBN: 3-900051-07-0 <http://www.R-project.org>
- Racimo F, Sankararaman S, Nielsen R, Huerta-Sanchez E (2015) Evidence for archaic adaptive introgression in humans. *Nature Reviews Genetics* **16**, 359-371.
- Rhymer JM, Simberloff D (1996) Extinction by hybridization and introgression. *Annual Review of Ecology and Systematics* **27**, 83-109.
- Riquet F, Daguin-Thiebaut C, Ballenghien M, Bierne N, Viard F (2013) Contrasting patterns of genome-wide polymorphism in the native and invasive range of the marine mollusc *Crepidula fornicata*. *Molecular Ecology* **22**, 1003-1018.
- Rius M, Darling JA (2014) How important is intraspecific genetic admixture to the success of colonising populations? *Trends in Ecology & Evolution* **29**, 233-242.
- Rohlfritsch A, Bierne N, Boudry P, et al. (2013) Population genomics shed light on the demographic and adaptive histories of European invasion in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Evolutionary Applications* **6**, 1064-1078.
- Rosenberg NA (2004) DISTRUCT: a program for the graphical display of population structure. *Molecular Ecology Notes* **4**, 137-138.
- Rousset F (2008) Genepop '007: a complete re-implementation of the Genepop software for Windows and Linux. *Molecular Ecology Resources* **8**, 103-106.
- Roux C, Fraisse C, Castric V, et al. (2014) Can we continue to neglect genomic variation in introgression rates when inferring the history of speciation? A case study in a *Mytilus* hybrid zone. *Journal of Evolutionary Biology* **27**, 1662-1675.
- Roux C, Tsagkogeorga G, Bierne N, Galtier N (2013) Crossing the species barrier: genomic hotspots of introgression between two highly divergent *Ciona intestinalis* species. *Molecular Biology and Evolution* **30**, 1574-1587.
- Sato A, Satoh N, Bishop JDD (2012) Field identification of 'types' A and B of the ascidian *Ciona intestinalis* in a region of sympatry. *Marine Biology* **159**, 1611-1619.
- Sato A, Shimeld SM, Bishop JDD (2014) Symmetrical reproductive compatibility of the two species in the *Ciona intestinalis* (Acidiacea) species complex, a model for marine genomics and developmental biology. *Zoological Science* **31**, 369-374.
- Satoh N, Rokhsar D, Nishikawa T (2014) Chordate evolution and the three-phylum system. *Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences* **281**, 20141729
- Seehausen O, Butlin RK, Keller I, et al. (2014) Genomics and the origin of species. *Nature Reviews Genetics* **15**, 176-192.
- Shenkar N, Swalla BJ (2011) Global diversity of Ascidiacea. *Plos One* **6**, e20657

- Sordino P, Andreakis N, Brown ER, *et al.* (2008) Natural variation of model mutant phenotypes in *Ciona intestinalis*. *Plos One* **3**, e2344
- Suzuki MM, Nishikawa T, Bird A (2005) Genomic approaches reveal unexpected genetic divergence within *Ciona intestinalis*. *Journal of Molecular Evolution* **61**, 627-635.
- Swenson NG, Howard DJ (2005) Clustering of contact zones, hybrid zones, and phylogeographic breaks in North America. *American Naturalist* **166**, 581-591.
- Tepolt CK, Palumbi SR (2015) Transcriptome sequencing reveals both neutral and adaptive genome dynamics in a marine invader. *Molecular Ecology* **24**, 4145-4158.
- Traustedt MPA (1885) Ascidiae simplices fra det Stille Ocean Vidensk. In: *Meddr dansk naturh.*, pp. 1-160, Foren, Kjobenhavn.
- Tsagkogeorga G, Cahais V, Galtier N (2012) The population genomics of a fast evolver: high levels of diversity, functional constraint, and molecular adaptation in the tunicate *Ciona intestinalis*. *Genome Biology and Evolution* **4**, 852-861.
- Turelli M, Barton NH, Coyne JA (2001) Theory and speciation. *Trends in Ecology & Evolution* **16**, 330-343.
- Turelli M, Orr HA (2000) Dominance, epistasis and the genetics of postzygotic isolation. *Genetics* **154**, 1663-1679.
- Wood TE, Burke JM, Rieseberg LH (2005) Parallel genotypic adaptation: when evolution repeats itself. *Genetica* **123**, 157-170.
- Wright S (1951) The genetical structure of populations. *Annals of Eugenics* **15**, 323-354.
- Zhan A, Darling JA, Bock DG, *et al.* (2012) Complex genetic patterns in closely related colonizing invasive species. *Ecology and Evolution* **2**, 1331-1346.
- Zhan A, Macisaac HJ, Cristescu ME (2010) Invasion genetics of the *Ciona intestinalis* species complex: from regional endemism to global homogeneity. *Molecular Ecology* **19**, 4678-4694.

Supplementary Information

Past and contemporary introgression between two strongly differentiated *Ciona* species as revealed by post-genomic SNP panel

Sarah Bouchemousse¹, Cathy Haag-Liautard^{2,3}, Nicolas Bierné^{2,3} and Frédérique Viard^{1,*}

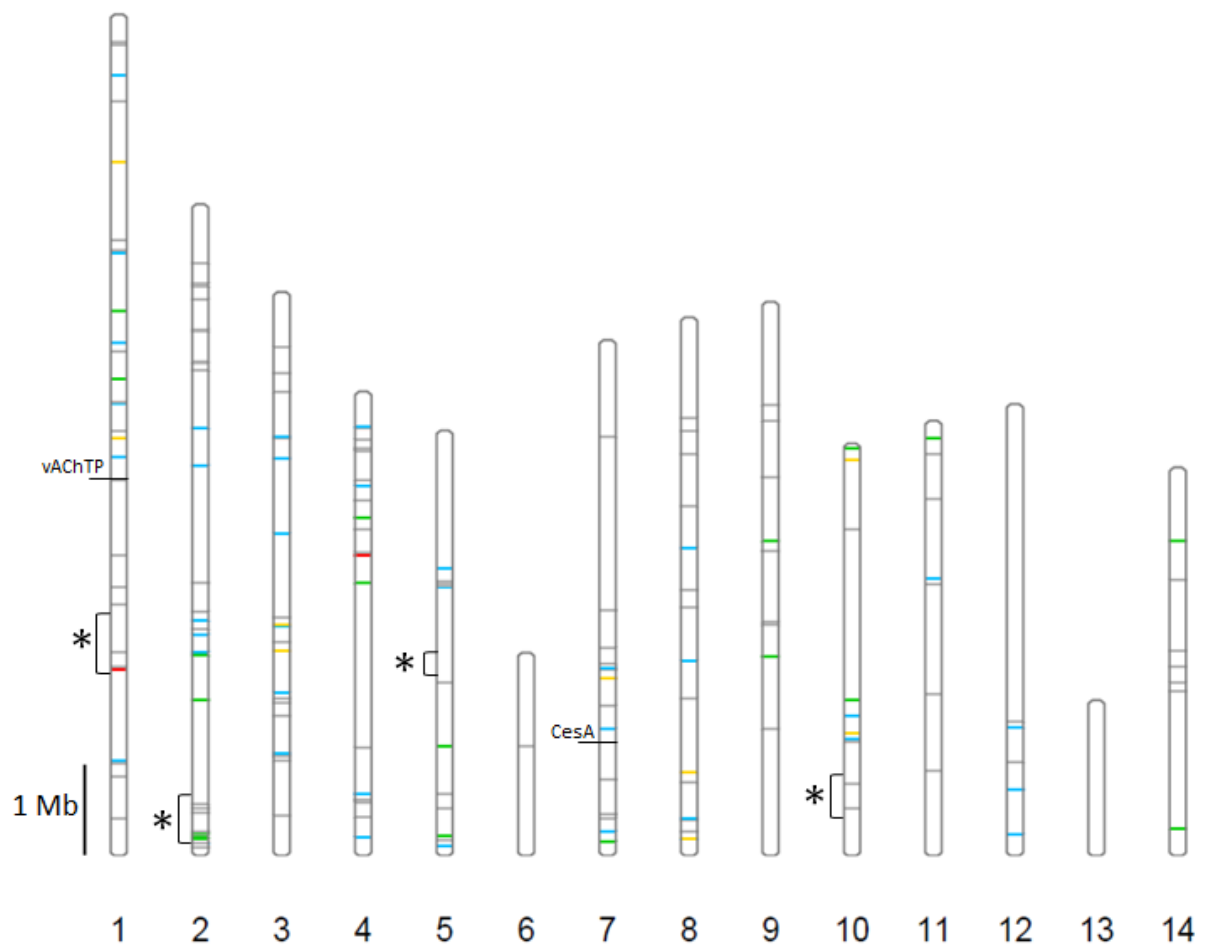


Figure S1. **Physical mapping of the 310 SNPs genotyped** (note that 62 of the 310 SNPs are not represented because they are located on non-mapped scaffolds). Color bars indicated the 114 loci selected for interspecific admixture analysis with different colors indicating categories of polymorphism according to the result of this study (see Table S1): sf (blue bars), sxB (green bars), sxA (gold bars) and ss (red bars). Asterisks indicate regions of introgression hotspots as defined by Roux *et al.* (2013). Two genes (vAchTP and CesA) used in previous studies looking for hybrids (e.g. Nydam & Harrison 2011; Sato *et al.* 2014; Bouchemousse *et al.* 2015) are also indicated (the remaining Hox5 locus, used in Caputi *et al.* (2007) and Bouchemousse *et al.* (2015), is located on a non-mapped scaffold).

Table S1. **Characteristics of the 310 SNPs genotyped, their allele frequencies and F_{st} values computed among allopatric localities (as references of no contemporary inter-specific gene flow) for *C. robusta* and *C. intestinalis***

cat.: category of SNP polymorphism in the study dataset (see caption of Table 2 in the main text for details); Chr: chromosome number (after no.14, the number corresponds to a non-mapped scaffold); Position (exact nucleotide position along the full genome in base pairs); HS intro (indicate SNPs that are localized in an introgression hotspots defined by Roux *et al.* (2013)).

Loc. 1 and Loc. 2: SE Pacific and Mediterranean localities (presence of *C. robusta* only). Loc. 3, Loc. 4a and 4b: NW Atlantic and Swedish localities (presence of *C. intestinalis* only). The 115 SNPs kept ($F_{st} > 0.8$) for interspecific admixture analyses (see Material and Methods in the main text) are indicated in bold. Species-diagnostic SNPs (i.e. differentially fixed between the two species and showing a heterozygote genotype on the natural F1-hybrid) are indicated in italic.

Index	SNPs characteristics				Allele frequency in allopatric populations								F _{ST}
	cat.	Chr.	Position	HS intro	C. robusta			C. intestinalis					
					Loc. 1	Loc. 2	All	Loc. 3	Loc. 4a	Loc. 4b	All		
snp266	sxB	1	414791	no	1.000	1.000	1.000	0.688	0.792	0.917	0.771	0.219	
snp215	sxB	1	908672	no	1.000	1.000	1.000	0.271	0.458	0.417	0.354	0.640	
snp56	sxB	1	1063227	no	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.542	0.885	0.099	
snp22	sf	1	1109920	no	1.000	1.000	1.000	0.000	0.000	0.000	0.000	1.000	
snp18	ss	1	2205837	yes	0.875	1.000	0.938	0.000	0.000	0.000	0.000	0.935	
snp367	sxB	1	2231134	yes	1.000	1.000	1.000	0.583	0.167	0.375	0.427	0.564	
snp108	ss	1	2402960	yes	0.979	0.978	0.979	0.958	0.917	0.917	0.938	0.011	
snp350	ss	1	2986331	no	0.979	1.000	0.990	1.000	1.000	1.000	1.000	0.000	
snp109	sxB	1	3195706	no	1.000	1.000	1.000	0.708	0.750	0.958	0.781	0.206	
snp159	sxA	1	3576763	no	0.938	1.000	0.969	1.000	1.000	1.000	1.000	0.022	
snp318	sxA	1	4483756	no	0.667	1.000	0.833	1.000	1.000	1.000	1.000	0.162	
snp260	sxB	1	4484320	no	1.000	1.000	1.000	0.750	0.708	0.292	0.625	0.365	
snp343	sxB	1	4762944	no	1.000	1.000	1.000	0.000	0.000	0.000	0.000	1.000	
snp102	sf	1	4763382	no	1.000	1.000	1.000	0.000	0.000	0.000	0.000	1.000	
snp329	sxA	1	4987764	no	0.792	0.913	0.852	0.000	0.000	0.000	0.000	0.851	
snp240	sxB	1	5073937	no	1.000	1.000	1.000	0.000	0.000	0.000	0.000	1.000	
snp172	sxB	1	5074210	no	1.000	1.000	1.000	0.250	0.083	0.375	0.240	0.756	
snp363	sxA	1	5074378	no	0.979	1.000	0.990	1.000	1.000	1.000	1.000	0.000	
snp255	ss	1	5074414	no	0.479	0.783	0.631	0.208	0.083	0.375	0.219	0.284	
snp124	sf	1	5395001	no	1.000	1.000	1.000	0.000	0.000	0.000	0.000	1.000	
snp115	sxA	1	5415221	no	0.688	1.000	0.844	1.000	1.000	1.000	1.000	0.151	
snp334	sf	1	5694948	no	1.000	1.000	1.000	0.000	0.000	0.000	0.000	1.000	
snp143	sxA	1	5694998	no	0.542	1.000	0.771	0.000	0.000	0.000	0.000	0.764	
snp47	sxB	1	5695260	no	1.000	1.000	1.000	0.063	0.000	0.000	0.031	0.968	
snp338	sxB	1	6027477	no	1.000	1.000	1.000	0.938	0.958	1.000	0.958	0.031	
snp105	sxA	1	6028067	no	0.750	0.587	0.668	1.000	1.000	1.000	1.000	0.326	
snp25	sf	1	6136134	no	1.000	1.000	1.000	0.000	0.000	0.000	0.000	1.000	
snp206	sxB	1	6506772	no	1.000	1.000	1.000	0.021	0.000	0.000	0.010	0.989	
snp113	sxB	1	7215261	no	1.000	1.000	1.000	0.417	0.083	0.125	0.260	0.734	
snp103	sf	1	7216496	no	1.000	1.000	1.000	0.000	0.000	0.000	0.000	1.000	
snp339	ss	1	7242782	no	0.646	0.717	0.682	1.000	0.833	0.875	0.927	0.166	
snp328	sxB	1	7357460	no	1.000	1.000	1.000	0.563	0.917	0.167	0.552	0.439	
snp11	sxA	1	8307018	no	0.938	1.000	0.969	0.000	0.000	0.000	0.000	0.968	
snp230	sxB	1	9032746	no	1.000	1.000	1.000	0.521	0.500	0.500	0.510	0.487	
snp239	sxB	1	9032786	no	1.000	1.000	1.000	0.125	0.000	0.000	0.063	0.936	
snp281	ss	1	9032828	no	0.583	0.717	0.650	0.000	0.000	0.000	0.000	0.648	
snp188	sf	1	9350711	no	1.000	1.000	1.000	0.000	0.000	0.000	0.000	1.000	
snp139	sxA	1	9718320	no	0.729	1.000	0.865	1.000	1.000	1.000	1.000	0.127	

snp68	sxB	1	9752321	no	1.000	1.000	1.000	0.396	0.708	0.458	0.490	0.502
snp1	sf	2	63538	no	1.000	1.000	1.000	0.000	0.000	0.000	0.000	1.000
snp146	sxA	2	63961	no	0.917	0.870	0.893	1.000	1.000	1.000	1.000	0.099
snp70	sxB	2	64337	no	1.000	1.000	1.000	0.896	0.167	1.000	0.740	0.245
snp218	sf	2	118366	no	1.000	1.000	1.000	0.000	0.000	0.000	0.000	1.000
snp138	sxA	2	118516	no	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.000
snp46	sxB	2	118564	no	1.000	1.000	1.000	0.667	0.167	0.000	0.375	0.617
snp55	sxB	2	173448	yes	1.000	1.000	1.000	0.125	0.083	0.000	0.083	0.915
snp154	sxB	2	179880	yes	1.000	1.000	1.000	0.042	0.000	0.000	0.021	0.979
snp170	sxA	2	227624	yes	0.625	0.957	0.791	1.000	1.000	1.000	1.000	0.205
snp66	sxB	2	228866	yes	1.000	1.000	1.000	0.000	0.000	0.000	0.000	1.000
snp39	sxB	2	251567	yes	1.000	1.000	1.000	0.000	0.000	0.000	0.000	1.000
snp186	sxA	2	251945	yes	0.479	0.696	0.587	0.000	0.000	0.000	0.000	0.583
snp49	sxB	2	251993	yes	1.000	1.000	1.000	0.896	0.958	0.292	0.760	0.226
snp35	sxB	2	476678	yes	1.000	1.000	1.000	0.000	0.000	0.000	0.000	1.000
snp63	ss	2	477077	yes	0.583	0.826	0.705	0.917	1.000	0.875	0.927	0.146
snp290	sxA	2	483036	yes	0.833	1.000	0.917	0.000	0.000	0.000	0.000	0.915
snp344	sxB	2	483351	yes	1.000	1.000	1.000	1.000	0.833	1.000	0.958	0.031
snp176	sxB	2	533683	no	1.000	1.000	1.000	0.563	0.958	1.000	0.771	0.219
snp73	ss	2	534013	no	0.750	0.457	0.603	1.000	1.000	1.000	1.000	0.390
snp198	sxB	2	578179	no	1.000	1.000	1.000	0.979	1.000	1.000	0.990	0.000
snp116	sxB	2	1834123	no	1.000	1.000	1.000	0.000	0.000	0.000	0.000	1.000
snp31	sxB	2	2372600	no	1.000	1.000	1.000	0.000	0.000	0.000	0.000	1.000
snp376	sxB	2	2417520	no	1.000	1.000	1.000	0.063	0.000	0.000	0.031	0.968
snp32	sf	2	2417784	no	1.000	1.000	1.000	0.000	0.000	0.000	0.000	1.000
snp308	sf	2	2627523	no	1.000	1.000	1.000	0.000	0.000	0.000	0.000	1.000
snp182	sxA	2	2684517	no	0.917	1.000	0.958	1.000	1.000	1.000	1.000	0.033
snp101	ss	2	2684820	no	1.000	0.978	0.989	0.625	0.208	0.083	0.385	0.589
snp110	sf	2	2786390	no	1.000	1.000	1.000	0.000	0.000	0.000	0.000	1.000
snp162	sxB	2	2900734	no	1.000	1.000	1.000	0.500	0.875	0.833	0.677	0.311
snp13	sxA	2	3247109	no	0.604	1.000	0.802	0.000	0.000	0.000	0.000	0.797
snp306	sf	2	4658149	no	1.000	1.000	1.000	0.000	0.000	0.000	0.000	1.000
snp340	sxB	2	5101067	no	1.000	1.000	1.000	0.833	0.917	1.000	0.896	0.095
snp383	sf	2	5101731	no	1.000	1.000	1.000	0.000	0.000	0.000	0.000	1.000
snp145	sxB	2	5795960	no	1.000	1.000	1.000	0.313	0.292	0.042	0.240	0.756
snp246	ss	2	5895850	no	0.771	1.000	0.885	0.229	0.167	0.083	0.177	0.663
snp84	ss	2	5896615	no	0.583	1.000	0.792	0.146	0.292	0.083	0.167	0.551
snp247	sxA	2	6262685	no	0.979	0.674	0.827	1.000	1.000	1.000	1.000	0.163
snp54	sxA	2	6294305	no	0.583	1.000	0.792	1.000	1.000	1.000	1.000	0.205
snp297	sxB	2	6294833	no	1.000	1.000	1.000	0.479	0.000	0.333	0.323	0.671
snp287	sf	2	6660331	no	1.000	1.000	1.000	0.000	0.000	0.000	0.000	1.000
snp165	sxA	2	6660358	no	0.521	0.500	0.510	0.000	0.000	0.000	0.000	0.513
snp370	sxB	2	6801805	no	1.000	1.000	1.000	0.087	0.250	1.000	0.356	0.631
snp78	sxB	2	6847076	no	1.000	1.000	1.000	0.646	0.625	0.500	0.604	0.388
snp276	sxA	2	7079634	no	0.792	0.804	0.798	0.000	0.000	0.000	0.000	0.798
snp249	ss	3	451355	no	0.896	0.609	0.752	0.917	1.000	1.000	0.958	0.146
snp341	sxA	3	1100321	no	0.938	0.913	0.925	1.000	1.000	1.000	1.000	0.066
snp369	sxB	3	1101017	no	1.000	1.000	1.000	0.917	0.833	1.000	0.917	0.074
snp27	sxB	3	1161884	no	1.000	1.000	1.000	0.896	0.875	1.000	0.917	0.071
snp288	sxA	3	1162010	no	0.167	0.413	0.290	0.000	0.000	0.000	0.000	0.281
snp256	sxB	3	1190641	no	1.000	1.000	1.000	0.604	0.750	0.875	0.708	0.281
snp187	sf	3	1190698	no	1.000	1.000	1.000	0.000	0.000	0.000	0.000	1.000
snp293	sxA	3	1644402	no	0.875	1.000	0.938	1.000	1.000	1.000	1.000	0.052

snp379	sxB	3	1798687	no	1.000	1.000	1.000	0.938	0.958	1.000	0.958	0.031
snp244	sxB	3	1848532	no	1.000	1.000	1.000	0.750	0.958	1.000	0.865	0.123
snp377	sxA	3	1848910	no	0.354	0.565	0.460	0.000	0.000	0.000	0.000	0.454
snp294	sf	3	1930758	no	1.000	1.000	1.000	0.000	0.000	0.000	0.000	1.000
snp155	sxA	3	2429568	no	0.750	0.935	0.842	0.000	0.000	0.000	0.000	0.841
snp194	sxA	3	2531188	no	0.500	0.674	0.587	0.000	0.000	0.000	0.000	0.582
snp220	sxB	3	2531736	no	1.000	1.000	1.000	0.417	0.375	0.708	0.479	0.511
snp120	sf	3	2728434	no	1.000	1.000	1.000	0.000	0.000	0.000	0.000	1.000
snp214	sxA	3	2743934	no	1.000	1.000	1.000	0.000	0.000	0.000	0.000	1.000
snp17	sxB	3	2830088	no	1.000	1.000	1.000	0.833	1.000	1.000	0.917	0.074
snp197	sf	3	3843873	no	1.000	1.000	1.000	0.000	0.000	0.000	0.000	1.000
snp45	sf	3	4740049	no	1.000	1.000	1.000	0.000	0.000	0.000	0.000	1.000
snp134	sxB	3	4982458	no	1.000	1.000	1.000	0.875	0.708	0.708	0.792	0.197
snp233	sf	3	5003239	no	1.000	1.000	1.000	0.000	0.000	0.000	0.000	1.000
snp41	sxA	3	5534447	no	0.708	0.913	0.811	1.000	1.000	1.000	1.000	0.185
snp59	sxB	3	5760414	no	1.000	1.000	1.000	0.000	0.000	0.000	0.000	1.000
snp371	sxA	3	5761572	no	0.688	1.000	0.844	0.000	0.000	0.000	0.000	0.840
snp82	sxB	3	5761929	no	1.000	1.000	1.000	0.979	0.958	1.000	0.979	0.010
snp205	sxA	3	6085809	no	0.188	0.543	0.365	0.000	0.000	0.000	0.000	0.357
snp136	sf	4	191930	no	1.000	1.000	1.000	0.000	0.000	0.000	0.000	1.000
snp72	sf	4	420193	no	1.000	1.000	1.000	0.000	0.000	0.000	0.000	1.000
snp37	sxA	4	420424	no	0.438	0.826	0.632	0.000	0.000	0.000	0.000	0.626
snp2	sxA	4	608398	no	0.792	0.739	0.765	1.000	1.000	1.000	1.000	0.227
snp259	ss	4	637562	no	0.875	0.870	0.872	1.000	1.000	1.000	1.000	0.119
snp50	sxB	4	638933	no	1.000	1.000	1.000	0.958	0.583	0.500	0.750	0.239
snp303	sf	4	707889	no	1.000	1.000	1.000	0.000	0.000	0.000	0.000	1.000
snp223	sxB	4	1270534	no	1.000	1.000	1.000	0.854	0.667	0.875	0.813	0.177
snp248	sxB	4	3237733	no	1.000	1.000	1.000	0.000	0.000	0.000	0.000	1.000
snp150	ss	4	3575332	no	0.958	1.000	0.979	0.208	0.125	0.000	0.135	0.835
snp258	sxA	4	3617354	no	0.479	0.413	0.446	1.000	1.000	1.000	1.000	0.552
snp225	sxB	4	3617924	no	1.000	1.000	1.000	0.875	0.917	0.958	0.906	0.082
snp77	sxB	4	3889603	no	1.000	1.000	1.000	0.958	0.958	0.875	0.938	0.053
snp349	sxB	4	4028088	no	1.000	1.000	1.000	0.000	0.000	0.000	0.000	1.000
snp362	ss	4	4235976	no	0.979	0.674	0.827	0.979	1.000	1.000	0.990	0.137
snp345	sf	4	4412519	no	1.000	1.000	1.000	0.000	0.000	0.000	0.000	1.000
snp270	sxB	4	4475096	no	1.000	1.000	1.000	0.708	0.750	1.000	0.792	0.197
snp309	sxA	4	4475480	no	0.875	0.848	0.861	1.000	1.000	1.000	1.000	0.130
snp75	ss	4	4831084	no	0.250	0.326	0.288	0.000	0.000	0.000	0.000	0.284
snp211	sxA	4	4845933	no	0.771	0.826	0.798	1.000	1.000	1.000	1.000	0.194
snp38	sxB	4	4846290	no	1.000	1.000	1.000	0.833	1.000	0.955	0.905	0.087
snp333	sxA	4	4852526	no	0.417	0.522	0.469	0.000	0.000	0.000	0.000	0.464
snp24	sxB	4	4867595	no	1.000	1.000	1.000	0.833	0.375	0.792	0.708	0.280
snp286	ss	4	4971806	no	0.813	1.000	0.906	0.854	0.917	0.750	0.844	0.005
snp12	sf	4	5111307	no	1.000	1.000	1.000	0.000	0.000	0.000	0.000	1.000
snp36	sxA	4	5111470	no	0.417	1.000	0.708	1.000	1.000	1.000	1.000	0.290
snp268	sf	4	5119511	no	1.000	1.000	1.000	0.000	0.000	0.000	0.000	1.000
snp161	sf	5	76363	no	1.000	1.000	1.000	0.000	0.000	0.000	0.000	1.000
snp44	sxB	5	153337	no	1.000	1.000	1.000	0.000	0.000	0.000	0.000	1.000
snp278	sxA	5	153688	no	0.958	1.000	0.979	1.000	1.000	1.000	1.000	0.011
snp118	sxB	5	197127	no	1.000	1.000	1.000	0.000	0.000	0.000	0.000	1.000
snp252	ss	5	529117	no	0.938	1.000	0.969	0.771	0.958	0.909	0.852	0.071
snp204	sxB	5	699006	no	1.000	1.000	1.000	0.917	0.542	1.000	0.844	0.137
snp178	sxB	5	1279954	no	1.000	1.000	1.000	0.000	0.000	0.000	0.000	1.000

snp16	sxB	5	2038176	no	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.917	0.979	0.000
snp274	sf	5	3191768	no	1.000	1.000	1.000	0.000	0.000	0.000	0.000	1.000
snp48	ss	5	3208641	no	0.583	0.565	0.574	0.896	0.958	0.958	0.927	0.278
snp51	sxB	5	3219354	no	1.000	1.000	1.000	1.000	0.917	0.833	0.938	0.053
snp359	sxA	5	3261936	no	0.979	1.000	0.990	1.000	1.000	1.000	1.000	0.000
snp33	sxB	5	3262071	no	1.000	1.000	1.000	0.583	0.417	0.542	0.531	0.459
snp283	ss	5	3414778	no	0.833	1.000	0.917	0.917	0.750	0.750	0.833	0.019
snp52	sf	5	3425248	no	1.000	1.000	1.000	0.000	0.000	0.000	0.000	1.000
snp241	sxB	6	1282558	no	1.000	1.000	1.000	0.500	0.958	0.458	0.604	0.384
snp236	sxB	7	136337	no	1.000	1.000	1.000	0.000	0.000	0.000	0.000	1.000
snp330	sf	7	259834	no	1.000	1.000	1.000	0.000	0.000	0.000	0.000	1.000
snp272	sxB	7	418779	no	1.000	1.000	1.000	0.250	0.292	0.167	0.240	0.756
snp121	sf	7	463451	no	1.000	1.000	1.000	0.000	0.000	0.000	0.000	1.000
snp85	sxB	7	463496	no	1.000	1.000	1.000	0.583	0.375	0.125	0.417	0.575
snp200	ss	7	881023	no	0.958	1.000	0.979	0.646	0.458	0.875	0.656	0.287
snp179	sf	7	1493954	no	1.000	1.000	1.000	0.000	0.000	0.000	0.000	1.000
snp10	sf	7	1770784	no	1.000	1.000	1.000	0.000	0.000	0.000	0.000	1.000
snp381	ss	7	1770922	no	0.604	0.761	0.683	1.000	1.000	1.000	1.000	0.313
snp212	sxB	7	1771534	no	1.000	1.000	1.000	0.396	0.750	0.250	0.448	0.544
snp87	sxB	7	2098237	no	1.000	1.000	1.000	0.771	0.292	0.917	0.688	0.301
snp235	sxA	7	2098582	no	0.979	0.978	0.979	0.000	0.000	0.000	0.000	0.979
snp354	sxA	7	2203208	no	0.583	0.609	0.596	1.000	1.000	1.000	1.000	0.401
snp149	ss	7	2203361	no	0.792	0.761	0.776	0.167	0.042	0.333	0.177	0.525
snp238	sxA	7	2209315	no	0.833	0.587	0.710	0.000	0.000	0.000	0.000	0.712
snp196	sxB	7	2209624	no	1.000	1.000	1.000	0.333	0.500	0.500	0.417	0.575
snp184	sxB	7	2222540	no	1.000	1.000	1.000	0.021	0.000	0.000	0.010	0.989
snp29	sf	7	2222625	no	1.000	1.000	1.000	0.000	0.000	0.000	0.000	1.000
snp137	sxA	7	2268247	no	0.729	0.391	0.560	1.000	1.000	1.000	1.000	0.433
snp94	sxA	7	2465122	no	0.417	0.478	0.447	0.000	0.000	0.000	0.000	0.443
snp131	sxB	7	2915901	no	1.000	1.000	1.000	0.625	0.750	0.542	0.635	0.356
snp114	sxB	7	4992424	no	1.000	1.000	1.000	0.729	0.833	0.917	0.802	0.186
snp62	sf	8	160616	no	1.000	1.000	1.000	0.000	0.000	0.000	0.000	1.000
snp209	sxA	8	174450	no	0.938	0.935	0.936	0.000	0.000	0.000	0.000	0.936
snp384	sxA	8	256454	no	0.813	0.739	0.776	0.000	0.000	0.000	0.000	0.776
snp217	sxB	8	393893	no	1.000	1.000	1.000	0.958	1.000	1.000	0.979	0.010
snp314	sxB	8	413938	no	1.000	1.000	1.000	0.125	0.250	0.000	0.125	0.872
snp86	sf	8	413980	no	1.000	1.000	1.000	0.000	0.000	0.000	0.000	1.000
snp253	sxA	8	840507	no	0.375	0.761	0.568	1.000	1.000	1.000	1.000	0.431
snp90	sxA	8	962330	no	1.000	0.978	0.989	0.000	0.000	0.000	0.000	0.989
snp307	ss	8	1859346	no	0.979	0.913	0.946	0.917	0.958	0.917	0.927	0.000
snp332	sf	8	2313257	no	1.000	1.000	1.000	0.000	0.000	0.000	0.000	1.000
snp300	sxB	8	2948303	no	1.000	1.000	1.000	0.563	0.417	0.333	0.469	0.524
snp67	sxA	8	3154619	no	0.750	0.826	0.788	1.000	1.000	1.000	1.000	0.206
snp365	sf	8	3667430	no	1.000	1.000	1.000	0.000	0.000	0.000	0.000	1.000
snp92	sf	8	4161357	no	1.000	1.000	1.000	0.000	0.000	0.000	0.000	1.000
snp372	sxB	8	4161426	no	1.000	1.000	1.000	0.604	0.455	0.458	0.530	0.463
snp135	sxB	8	4786382	no	1.000	1.000	1.000	0.667	0.000	0.208	0.385	0.606
snp15	sxB	8	5073716	no	1.000	1.000	1.000	0.955	1.000	1.000	0.977	0.003
snp380	sxB	8	5232250	no	1.000	1.000	1.000	0.750	1.000	0.958	0.865	0.126
snp168	sxB	9	1484808	no	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.000
snp133	sxB	9	2358923	no	1.000	1.000	1.000	0.000	0.000	0.000	0.000	1.000
snp125	sxB	9	2732667	no	1.000	1.000	1.000	0.833	0.917	0.833	0.854	0.132
snp296	sxA	9	2771243	no	0.813	0.587	0.700	1.000	1.000	1.000	1.000	0.292

snp265	sxB	9	3628263	no	1.000	1.000	1.000	0.833	0.500	0.750	0.729	0.260
snp117	sxB	9	3742199	no	1.000	1.000	1.000	0.042	0.000	0.083	0.042	0.958
snp5	sf	9	4514869	no	1.000	1.000	1.000	0.000	0.000	0.000	0.000	1.000
snp89	sxB	9	4515172	no	1.000	1.000	1.000	0.729	0.417	0.792	0.667	0.325
snp317	sxB	9	5185795	no	1.000	1.000	1.000	0.646	0.250	0.250	0.448	0.543
snp219	sf	9	5379609	no	1.000	1.000	1.000	0.000	0.000	0.000	0.000	1.000
snp144	ss	9	5379938	no	0.938	0.891	0.914	0.688	1.000	0.875	0.813	0.031
snp152	sxB	10	526821	yes	1.000	1.000	1.000	0.875	0.875	0.917	0.885	0.105
snp8	sxB	10	533223	yes	1.000	1.000	1.000	0.354	0.292	0.167	0.292	0.703
snp373	sxA	10	828723	yes	0.646	0.848	0.747	1.000	1.000	1.000	1.000	0.248
snp185	ss	10	828753	yes	0.500	0.848	0.674	0.813	1.000	0.958	0.896	0.129
snp164	sxA	10	1326368	no	0.958	1.000	0.979	1.000	1.000	1.000	1.000	0.011
snp104	sxB	10	1326494	no	1.000	1.000	1.000	0.792	0.708	1.000	0.823	0.166
snp132	ss	10	1370640	no	0.958	1.000	0.979	1.000	1.000	1.000	1.000	0.011
snp229	sf	10	1370821	no	1.000	1.000	1.000	0.000	0.000	0.000	0.000	1.000
snp325	sf	10	1431323	no	1.000	1.000	1.000	0.000	0.000	0.000	0.000	1.000
snp156	sxB	10	1431944	no	1.000	1.000	1.000	0.271	0.625	0.417	0.396	0.597
snp237	sxA	10	1431979	no	0.854	1.000	0.927	0.000	0.000	0.000	0.000	0.926
snp190	sf	10	1644037	no	1.000	1.000	1.000	0.000	0.000	0.000	0.000	1.000
snp374	sxB	10	1829131	no	1.000	1.000	1.000	0.042	0.000	0.375	0.115	0.883
snp83	sxB	10	3881287	no	1.000	1.000	1.000	0.375	0.917	0.875	0.635	0.354
snp122	sxA	10	4729725	no	1.000	1.000	1.000	0.000	0.000	0.000	0.000	1.000
snp221	sxB	10	4866550	no	1.000	1.000	1.000	0.000	0.000	0.000	0.000	1.000
snp81	sxB	11	977658	no	1.000	1.000	1.000	0.771	0.708	0.708	0.740	0.251
snp166	ss	11	1904080	no	0.958	0.630	0.794	0.000	0.000	0.000	0.000	0.797
snp226	sf	11	1907473	no	1.000	1.000	1.000	0.000	0.000	0.000	0.000	1.000
snp203	sxA	11	1907554	no	0.625	0.652	0.639	1.000	1.000	1.000	1.000	0.357
snp6	sxA	11	3225028	no	0.771	0.696	0.733	1.000	1.000	1.000	1.000	0.260
snp151	sf	11	3291525	no	1.000	1.000	1.000	0.000	0.000	0.000	0.000	1.000
snp352	sf	11	4253899	no	1.000	1.000	1.000	0.000	0.000	0.000	0.000	1.000
snp175	sxA	11	4253954	no	1.000	0.978	0.989	1.000	1.000	1.000	1.000	0.000
snp262	sxB	11	4790343	no	1.000	1.000	1.000	0.896	0.792	0.875	0.865	0.121
snp315	sxB	11	4987955	no	1.000	1.000	1.000	0.000	0.000	0.000	0.000	1.000
snp174	sf	12	223704	no	1.000	1.000	1.000	0.000	0.000	0.000	0.000	1.000
snp210	sf	12	759131	no	1.000	1.000	1.000	0.000	0.000	0.000	0.000	1.000
snp348	sxB	12	1086526	no	1.000	1.000	1.000	0.938	0.917	1.000	0.948	0.042
snp222	sf	12	1503856	no	1.000	1.000	1.000	0.000	0.000	0.000	0.000	1.000
snp364	sxB	12	1572677	no	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.000
snp299	sxA	12	1573004	no	0.500	0.739	0.620	1.000	1.000	1.000	1.000	0.378
snp353	sxB	14	283115	no	1.000	1.000	1.000	0.208	0.042	0.000	0.115	0.883
snp99	sxB	14	1944967	no	1.000	1.000	1.000	1.000	0.958	1.000	0.990	0.000
snp160	sxB	14	2052390	no	1.000	1.000	1.000	0.625	0.750	0.958	0.740	0.249
snp312	sxA	14	2235245	no	0.708	0.761	0.735	1.000	1.000	1.000	1.000	0.262
snp251	sf	14	2235545	no	1.000	1.000	1.000	0.000	0.000	0.000	0.000	1.000
snp326	sxB	14	2236220	no	1.000	1.000	1.000	0.250	0.125	0.583	0.302	0.693
snp357	sxB	14	2424063	no	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.000
snp95	ss	14	2424137	no	0.208	0.565	0.387	0.021	0.042	0.000	0.021	0.332
snp254	sxB	14	3284624	no	1.000	1.000	1.000	0.396	0.042	0.000	0.208	0.787
snp167	sxB	14	3748763	no	1.000	1.000	1.000	0.000	0.000	0.000	0.000	1.000
snp19	sf	23	43134	no	1.000	1.000	1.000	0.000	0.000	0.000	0.000	1.000
snp20	sxB	23	48748	no	1.000	1.000	1.000	0.021	0.083	0.042	0.042	0.958
snp181	ss	37	84812	no	0.625	1.000	0.813	0.000	0.000	0.000	0.000	0.808
snp273	ss	37	152661	no	0.938	0.913	0.925	1.000	1.000	1.000	1.000	0.066

snp158	sxA	42	67444	no	1.000	0.957	0.978	1.000	1.000	1.000	1.000	0.011
snp271	sxB	49	140348	no	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.917	0.979	0.010
snp193	sxA	49	273227	no	0.813	0.609	0.711	1.000	1.000	1.000	1.000	0.283
snp106	sxA	52	936	no	0.979	0.935	0.957	1.000	1.000	1.000	1.000	0.033
snp263	sxB	62	63214	no	1.000	1.000	1.000	0.063	0.000	0.000	0.031	0.968
snp142	ss	62	63338	no	0.958	1.000	0.979	1.000	1.000	1.000	1.000	0.011
snp177	ss	75	691527	no	0.625	0.761	0.693	0.000	0.000	0.000	0.000	0.690
snp282	ss	94	369979	no	0.917	1.000	0.958	0.958	0.875	0.708	0.875	0.031
snp30	sxA	98	54303	no	0.875	0.565	0.720	1.000	1.000	1.000	1.000	0.269
snp107	sxA	98	128272	no	0.688	0.826	0.757	0.000	0.000	0.000	0.000	0.754
snp169	sxB	98	128407	no	1.000	1.000	1.000	0.646	0.958	1.000	0.813	0.174
snp207	sxB	98	128494	no	1.000	1.000	1.000	0.000	0.000	0.000	0.000	1.000
snp351	sxB	98	166571	no	1.000	1.000	1.000	1.000	0.958	1.000	0.990	0.000
snp183	sxA	98	207095	no	0.917	1.000	0.958	1.000	1.000	1.000	1.000	0.033
snp360	sf	98	910443	no	1.000	1.000	1.000	0.000	0.000	0.000	0.000	1.000
snp257	ss	98	915948	no	0.708	0.587	0.648	0.708	1.000	1.000	0.854	0.098
snp323	sxA	103	62605	no	0.271	0.696	0.483	1.000	1.000	1.000	1.000	0.517
snp337	sxB	103	62716	no	1.000	1.000	1.000	0.458	0.542	0.500	0.490	0.507
snp3	sf	103	362542	no	1.000	1.000	1.000	0.000	0.000	0.000	0.000	1.000
snp366	sxB	103	362833	no	1.000	1.000	1.000	0.833	0.708	0.833	0.802	0.186
snp69	sxB	103	366420	no	1.000	1.000	1.000	0.875	0.875	0.917	0.885	0.105
snp119	sxA	103	366738	no	0.896	0.783	0.839	1.000	1.000	1.000	1.000	0.154
snp304	sxB	105	3452	no	1.000	1.000	1.000	0.771	0.958	1.000	0.875	0.114
snp331	sxB	105	3524	no	1.000	1.000	1.000	1.000	0.917	1.000	0.979	0.010
snp79	ss	120	170654	no	0.563	0.891	0.727	0.000	0.000	0.000	0.000	0.722
snp234	sxA	137	179389	no	0.542	0.457	0.499	1.000	1.000	1.000	1.000	0.498
snp23	ss	141	14705	no	0.688	0.652	0.670	0.146	0.667	0.292	0.313	0.220
snp285	sxB	166	224331	no	1.000	1.000	1.000	0.583	0.417	0.500	0.521	0.471
snp291	ss	166	224607	no	0.917	1.000	0.958	0.063	0.167	0.042	0.083	0.865
snp346	sf	166	224649	no	1.000	1.000	1.000	0.000	0.000	0.000	0.000	1.000
snp74	ss	166	224850	no	0.771	1.000	0.885	0.000	0.042	0.000	0.010	0.870
snp311	sf	170	35649	no	1.000	1.000	1.000	0.000	0.000	0.000	0.000	1.000
snp127	sxB	170	35904	no	1.000	1.000	1.000	0.250	0.375	0.417	0.323	0.671
snp191	sxA	170	36054	no	0.208	0.717	0.463	1.000	1.000	1.000	1.000	0.539
snp356	sxA	184	34695	no	0.958	0.891	0.925	1.000	1.000	1.000	1.000	0.066
snp141	sxB	192	4717	no	1.000	1.000	1.000	0.833	0.333	0.792	0.698	0.293
snp261	sxB	262	248150	no	1.000	1.000	1.000	0.792	0.833	0.458	0.719	0.271
snp9	sxA	290	7970	no	1.000	0.935	0.967	1.000	1.000	1.000	1.000	0.022
snp382	sxB	290	8037	no	1.000	1.000	1.000	0.000	0.000	0.000	0.000	1.000
snp65	sxB	290	8101	no	1.000	1.000	1.000	0.646	0.917	0.833	0.760	0.228
snp192	sxA	662	1336	no	0.917	1.000	0.958	1.000	1.000	1.000	1.000	0.028
snp231	sf	662	1378	no	1.000	1.000	1.000	0.000	0.000	0.000	0.000	1.000
snp80	sxB	1063	48786	no	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.000
snp43	ss	1063	49359	no	0.104	0.978	0.541	0.188	0.750	0.542	0.417	0.010
snp313	sf	1063	49515	no	1.000	1.000	1.000	0.000	0.000	0.000	0.000	1.000
snp245	ss	1069	14160	no	0.417	0.543	0.480	0.021	0.375	0.000	0.104	0.287
snp336	sf	1111	36694	no	1.000	1.000	1.000	0.000	0.000	0.000	0.000	1.000
snp321	sxA	1114	20660	no	0.854	0.848	0.851	1.000	1.000	1.000	1.000	0.141
snp202	sf	1114	21133	no	1.000	1.000	1.000	0.000	0.000	0.000	0.000	1.000
snp324	sxA	1126	10524	no	0.521	0.457	0.489	1.000	1.000	1.000	1.000	0.509
snp280	sxB	1126	10961	no	1.000	1.000	1.000	0.729	0.458	0.500	0.604	0.387
snp327	sf	1126	36378	no	1.000	1.000	1.000	0.000	0.000	0.000	0.000	1.000
snp147	sxB	1144	26090	no	1.000	1.000	1.000	0.979	1.000	1.000	0.990	0.000

snp322	sxA	1144	26125	no	0.250	0.522	0.386	1.000	1.000	1.000	1.000	0.615
snp275	sf	1152	2594	no	1.000	1.000	1.000	0.000	0.000	0.000	0.000	1.000
snp88	sxB	1157	11870	no	1.000	1.000	1.000	0.417	0.458	0.917	0.552	0.437
snp195	ss	1157	12038	no	0.396	0.478	0.437	0.000	0.000	0.000	0.000	0.432
snp111	sf	1158	18976	no	1.000	1.000	1.000	0.000	0.000	0.000	0.000	1.000
snp26	sf	1160	30058	no	1.000	1.000	1.000	0.000	0.000	0.000	0.000	1.000
snp34	sxB	1272	9864	no	1.000	1.000	1.000	0.083	0.000	0.000	0.042	0.958

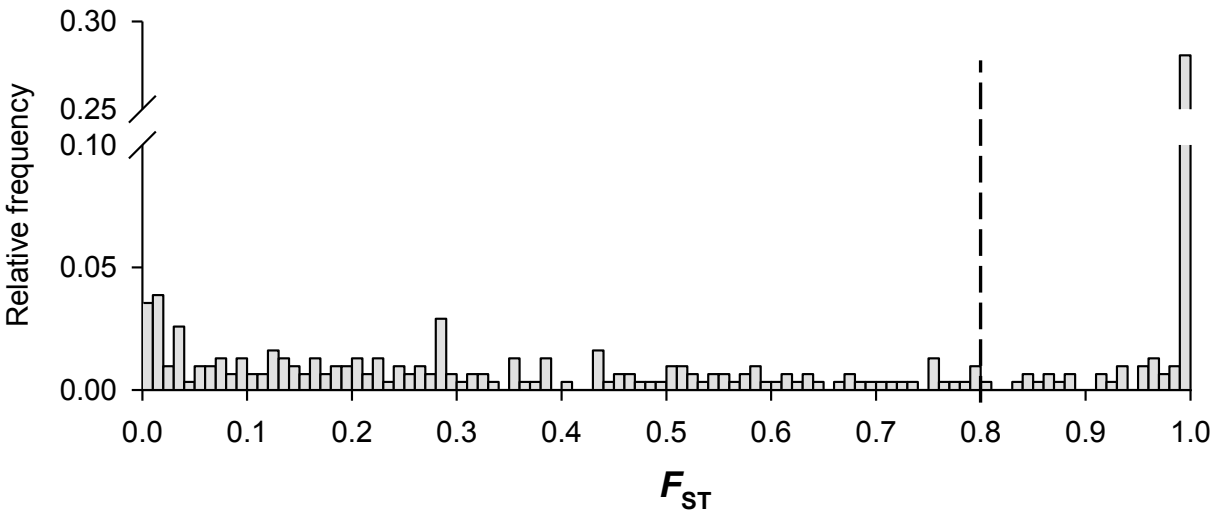


Figure S2. **Distribution of interspecific differentiation given by F_{ST} values** using populations in the allopatric ranges of the two species (no. 1 and 2 for *C. robusta* and no. 3, 4a and 4b for *C. intestinalis*) as a reference for absence of contemporary gene flow. Dashed line separates the subset of 115 loci with F_{ST} values strictly superior to 0.8.

Table S2. **Estimates of pairwise population genetic differentiation for *Ciona robusta* (a) and *C. intestinalis* (b).**

Fixation indices F_{ST} were computed based 115 and 166 polymorphic loci for *C. robusta* and *C. intestinalis*, respectively. Bold numbers indicate statistical significance (P -value < 0.05).

a) <i>C. robusta</i>	1-Guanaqueros	2-Etang de Thau	5-Falmouth	6-Plymouth	7-St Vaast	8-Perros Guirec	10-Moulin Blanc	11-Camaret
2-Etang de Thau	0.122							
5-Falmouth	0.130	0.055						
6-Plymouth	0.114	0.038	0.017					
7-St Vaast	0.123	0.021	0.040	0.026				
8-Perros Guirec	0.123	0.029	0.024	0.024	0.017			
10-Moulin Blanc	0.134	0.027	0.045	0.034	0.018	0.018		
11-Camaret	0.121	0.022	0.027	0.028	0.017	0.016	0.004	
12-Quiberon	0.115	0.013	0.012	0.013	0.010	0.014	0.023	0.012

b) <i>C. intestinalis</i>	3-Nahant	4a-Fiske.- surface	4b-Fiske.- 20m	5-Falmouth	6-Plymouth	7-St Vaast	8-Perros Guirec	9-Aber Wrac'h	10-Moulin Blanc	11-Camaret
4a-Fiske.-surface	0.121									
4b-Fiske.-20m	0.147	0.151								
5-Falmouth	0.039	0.076	0.134							
6-Plymouth	0.050	0.097	0.159	0.017						
7-St Vaast	0.035	0.087	0.124	0.019	0.031					
8-Perros Guirec	0.036	0.086	0.128	0.012	0.026	0.000				
9-Aber Wrac'h	0.031	0.095	0.143	0.013	0.024	0.011	0.006			
10-Moulin Blanc	0.029	0.083	0.135	0.014	0.021	0.011	0.007	0.003		
11-Camaret	0.035	0.090	0.141	0.007	0.021	0.009	0.005	-0.004	-0.001	
12-Quiberon	0.035	0.098	0.128	0.016	0.025	0.014	0.006	0.004	-0.003	-0.002

Table S3. **P-values of permutations test** (9999 Monte-Carlo resamplings, using coin R package (Hothorn et al. 2008)) **testing the population differentiation on hybrid index values for *C. robusta* (a) and *C. intestinalis* (b).** P-values (corrected by a FDR adjustment) in bold indicate statistical significance (P -value < 0.05).

a)	1-Guanaqueros	2-Etang de Thau	5-Falmouth	6-Plymouth	7-St Vaast	8-Perros Guirec	10-Moulin Blanc	11-Camaret
2-Etang de Thau	<0.001							
5-Falmouth	<0.001	0.004						
6-Plymouth	<0.001	0.038	0.651					
7-St Vaast	<0.001	0.098	0.280	0.842				
8-Perros Guirec	<0.001	0.012	0.911	0.817	0.512			
10-Moulin Blanc	<0.001	0.057	0.513	0.886	0.886	0.651		
11-Camaret	<0.001	0.022	0.588	0.992	0.868	0.541	0.886	
12-Quiberon	<0.001	0.014	0.651	0.886	0.673	0.868	0.843	0.881

b)	3-Nahant	4a-Fiske.- surface	4b-Fiske.- 20m	5-Falmouth	6-Plymouth	7-St Vaast	8-Perros Guirec	9-Aber Wrac'h	10-Moulin Blanc	11-Camaret without F1-hybrid
4a-Fiske.- surface	0.230									
4b-Fiske.-20m	0.046	0.440								
5-Falmouth	0.815	0.183	0.026							
6-Plymouth	0.704	0.524	0.041	0.849						
7-St Vaast	0.706	0.104	0.009	0.553	0.440					
8-Perros Guirec	0.440	0.043	<0.001	0.212	0.204	0.670				
9-Aber Wrac'h	0.810	0.093	0.009	0.580	0.518	0.880	0.548			
10-Moulin Blanc	0.197	0.024	<0.001	0.046	0.076	0.385	0.606	0.259		
11-Camaret without F1- hybrid	0.810	0.077	0.009	0.606	0.518	0.849	0.584	0.118	0.259	
12-Quiberon	0.516	0.077	0.009	0.322	0.260	0.406	1.000	0.606	0.633	0.633

Table S4. **Characteristics of the 50 SNPs sharing polymorphism between the two species amongst the 115 SNPs selected for interspecific gene flow analyses ($F_{ST} > 0.8$).** Allele frequencies in populations sampled in the allopatric (localities 1 and 2 for *C. robusta* and localities 3 and 4a/4b for *C. intestinalis*) and sympatric ranges (Loc. 5 to 12 for both species) of the two species are given. See caption of Table S2 for details of abbreviation. In bold are loci showing atypical allele frequencies (i.e. higher frequency of *C. intestinalis* allele) in the single populations of SE Pacific (Loc.1) compared to other populations of *C. robusta*.

SNPs characteristics					Allele frequency							Ensembl Gene ID	Protein Description
					C. robusta			C. intestinalis					
Index	cat.	Chr	Position	HS introg	Loc. 1	Loc. 2	Loc. 5 to 12	Loc. 3	Loc. 4a	Loc. 4b	Loc. 5 to 12		
snp18	ss	1	2205837	yes	0.875	1.000	0.994	0.000	0.000	0.000	0.008	ENSCING00000004302	Uncharacterized protein
snp343	sxB	1	4762944	no	1.000	1.000	1.000	0.000	0.000	0.000	0.005	ENSCING00000005260	Uncharacterized protein
snp329	sxA	1	4987764	no	0.792	0.913	0.675	0.000	0.000	0.000	0.000	ENSCING00000005329	Mitochondrial genome maintenance exonuclease 1
snp240	sxB	1	5073937	no	1.000	1.000	1.000	0.000	0.000	0.000	0.005	ENSCING000000019274	Proteasome Z submit (zeta-201)
snp47	sxB	1	5695260	no	1.000	1.000	1.000	0.063	0.000	0.000	0.101	ENSCING000000012769	Zinc finger protein
snp206	sxB	1	6506772	no	1.000	1.000	1.000	0.021	0.000	0.000	0.005	Unknow	
snp11	sxA	1	8307018	no	0.938	1.000	0.982	0.000	0.000	0.000	0.000	Unknow	
snp239	sxB	1	9032786	no	1.000	1.000	1.000	0.125	0.000	0.000	0.021	ENSCING00000000038	Uncharacterized protein
snp55	sxB	2	173448	yes	1.000	1.000	1.000	0.125	0.083	0.000	0.040	Unknow	
snp154	sxB	2	179880	yes	1.000	1.000	1.000	0.042	0.000	0.000	0.045	ENSCING000000004185	Uncharacterized protein
snp66	sxB	2	228866	yes	1.000	1.000	1.000	0.000	0.000	0.000	0.048	Unknow	
snp39	sxB	2	251567	yes	1.000	1.000	1.000	0.000	0.000	0.000	0.005	ENSCING000000004218	Uncharacterized protein
snp35	sxB	2	476678	yes	1.000	1.000	1.000	0.000	0.000	0.000	0.003	Unknow	
snp290	sxA	2	483036	yes	0.833	1.000	1.000	0.000	0.000	0.000	0.000	Unknow	
snp116	sxB	2	1834123	no	1.000	1.000	1.000	0.000	0.000	0.000	0.013	Unknow	
snp31	sxB	2	2372600	no	1.000	1.000	1.000	0.000	0.000	0.000	0.005	Unknow	
snp376	sxB	2	2417520	no	1.000	1.000	1.000	0.063	0.000	0.000	0.016	ENSCING000000005003	Uncharacterized protein
snp155	sxA	3	2429568	no	0.750	0.935	0.976	0.000	0.000	0.000	0.000	Unknow	
snp120	sxB	3	2728434	no	1.000	1.000	1.000	0.000	0.000	0.000	0.003	ENSCING000000023156	Uncharacterized protein
snp214	sxA	3	2743934	no	1.000	1.000	0.997	0.000	0.000	0.000	0.000	ENSCING000000009577	Uncharacterized protein
snp59	sxB	3	5760414	no	1.000	1.000	1.000	0.000	0.000	0.000	0.019	ENSCING000000019791	Uncharacterized protein
snp371	sxA	3	5761572	no	0.688	1.000	1.000	0.000	0.000	0.000	0.000	ENSCING000000019791	Uncharacterized protein
snp248	sxB	4	3237733	no	1.000	1.000	1.000	0.000	0.000	0.000	0.003	Unknow	
snp150	ss	4	3575332	no	0.958	1.000	1.000	0.208	0.125	0.000	0.346	ENSCING000000005008	Uncharacterized protein
snp349	sxB	4	4028088	no	1.000	1.000	1.000	0.000	0.000	0.000	0.008	ENSCING000000008884	Uncharacterized protein
snp44	sxB	5	153337	no	1.000	1.000	1.000	0.000	0.000	0.000	0.003	ENSCING000000022288	Uncharacterized protein

snp118	sxB	5	197127	no	1.000	1.000	1.000	0.000	0.000	0.000	0.003	ENSCING00000007496	Uncharacterized protein
snp178	sxB	5	1279954	no	1.000	1.000	1.000	0.000	0.000	0.000	0.038	Unknow	
snp236	sxB	7	136337	no	1.000	1.000	1.000	0.000	0.000	0.000	0.008	ENSCING000000024960	Uncharacterized protein
snp235	sxA	7	2098582	no	0.979	0.978	0.928	0.000	0.000	0.000	0.000	Unknow	
snp184	sxB	7	2222540	no	1.000	1.000	1.000	0.021	0.000	0.000	0.048	ENSCING00000007874	Uncharacterized protein
snp209	sxA	8	174450	no	0.938	0.935	0.855	0.000	0.000	0.000	0.000	ENSCING00000008350	Uncharacterized protein
snp314	sxB	8	413938	no	1.000	1.000	1.000	0.125	0.250	0.000	0.136	Unknow	
snp90	sxA	8	962330	no	1.000	0.978	0.994	0.000	0.000	0.000	0.000	ENSCING000000020390	Ar20 protein
snp133	sxB	9	2358923	no	1.000	1.000	1.000	0.000	0.000	0.000	0.080	ENSCING000000014133	Eukaryotic translation initiation factor 6
snp117	sxB	9	3742199	no	1.000	1.000	1.000	0.042	0.000	0.083	0.016	ENSCING000000013017	60S ribosomal protein L18
snp237	sxA	10	1431979	no	0.854	1.000	0.976	0.000	0.000	0.000	0.000	ENSCING00000010029	Histone H2A
snp374	sxB	10	1829131	no	1.000	1.000	1.000	0.042	0.000	0.375	0.093	ENSCING00000008256	KDEL receptor (erd 2)
snp122	sxA	10	4729725	no	1.000	1.000	0.982	0.000	0.000	0.000	0.000	Unknow	
snp221	sxB	10	4866550	no	1.000	1.000	1.000	0.000	0.000	0.000	0.021	ENSCING000000023081	Uncharacterized protein
snp315	sxB	11	4987955	no	1.000	1.000	1.000	0.000	0.000	0.000	0.005	ENSCING00000000723	Uncharacterized protein
snp353	sxB	14	283115	no	1.000	1.000	1.000	0.208	0.042	0.000	0.037	ENSCING000000015026	Uncharacterized protein
snp167	sxB	14	3748763	no	1.000	1.000	1.000	0.000	0.000	0.000	0.013	ENSCING00000004075	Transcription factor protein (hmg 1/2)
snp20	sxB	23	48748	no	1.000	1.000	1.000	0.021	0.083	0.042	0.016	Unknow	
snp181	ss	37	84812	no	0.625	1.000	1.000	0.000	0.000	0.000	0.003	Unknow	
snp263	sxB	62	63214	no	1.000	1.000	1.000	0.063	0.000	0.000	0.000	ENSCING000000001276	Uncharacterized protein
snp207	sxB	98	128494	no	1.000	1.000	1.000	0.000	0.000	0.000	0.016	ENSCING000000016399	Uncharacterized protein
snp291	ss	166	224607	no	0.917	1.000	1.000	0.063	0.167	0.042	0.149	ENSCING00000019946	Uncharacterized protein
snp74	ss	166	224850	no	0.771	1.000	1.000	0.000	0.042	0.000	0.029	ENSCING00000019946	Uncharacterized protein
snp34	sxB	1272	9864	no	1.000	1.000	1.000	0.083	0.000	0.000	0.043	ENSCING00000008321	Zinc finger protein

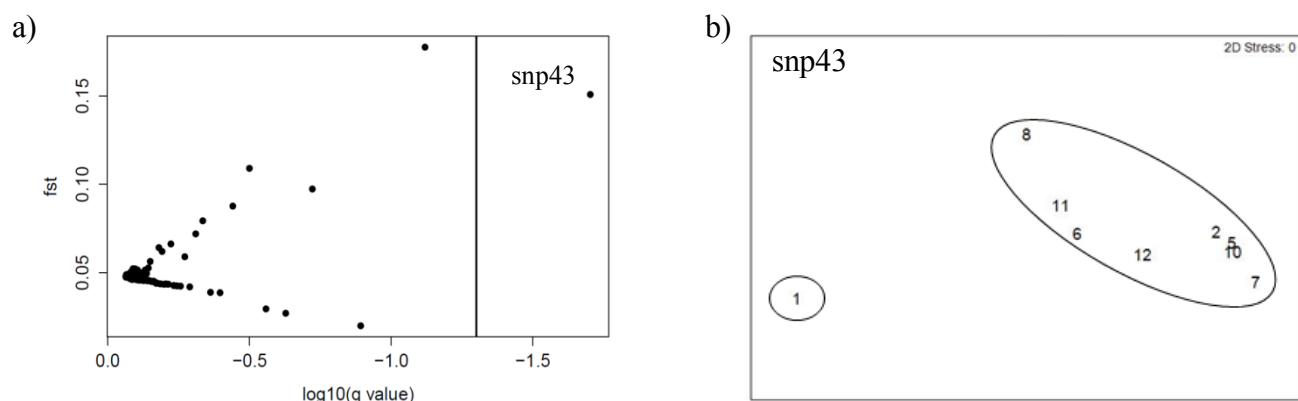


Figure S3. **Result of outlier detection analyses for *C. robusta* using BAYESCAN.**

a) Output plot of the software representing the F_{ST} values according to the \log_{10} of the Q-value for the 116 loci examined. The solid line indicates strong evidence of selection following Jeffrey's interpretation scale (Jeffrey 1961). b) Non-metric multidimensional scaling plots (Bray-Curtis similarity) using allele frequency at the outlier locus. Populations included in the same circle are not significantly different from each other (pairwise comparison, P -value > 0.05).

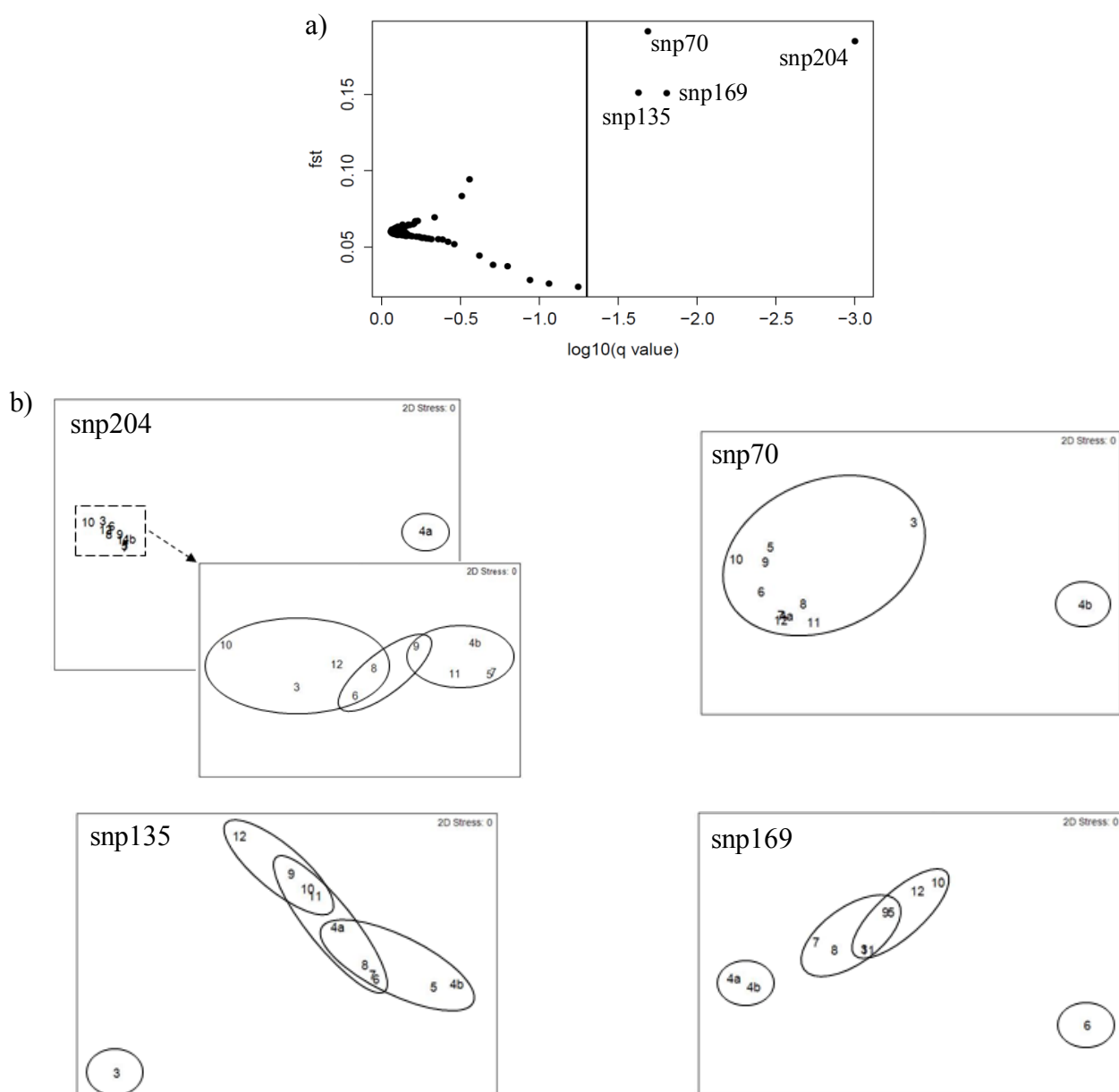


Figure S4. **Result of outlier detection analyses for *C. intestinalis* using BAYESCAN.** See caption of Figure S3 for details.

- Chapitre 5 -

Quelle est l'histoire démographique et migratoire des deux espèces à l'échelle mondiale ?

I. Contexte et synopsis de l'étude

Dans la précédente étude basée sur l'analyse de marqueurs SNPs, nous avons étendu l'aire d'étude par rapport aux chapitres précédents, afin de pouvoir contraster les observations réalisées dans la zone de sympatrie avec des populations présentes dans des zones allopatriques. Des résultats intéressants et inattendus ont été observés notamment dans la population chilienne de *C. robusta* qui a montré des patrons d'introggression différents de ceux observés pour cette espèce en Europe. Ces résultats associés à d'autres de la littérature (ex. Zhan *et al.* 2012 ; Roux *et al.* 2013) nous ont conduits à développer une approche phylogéographique, à une échelle mondiale pour *C. intestinalis* et *C. robusta*. Cette étude se justifie particulièrement en regard de la large distribution géographique des deux espèces. Comme expliqué dans l'introduction générale, les introductions biologiques sont à l'origine de profondes modifications des aires de distribution des espèces. De par l'augmentation du transport maritime et les échanges d'espèces entre régions à des fins d'aquaculture, le nombre d'espèces introduites à l'échelle mondiale a considérablement augmenté au cours du dernier siècle. Les deux espèces *C. robusta* et *C. intestinalis* sont des témoins de ces transports et échanges, avec notamment une distribution géographique dans tous les océans (excepté l'océan Austral ; Figure 1) pour *C. robusta*.

Un autre intérêt de cette étude à une grande échelle est la réévaluation taxonomique récente des deux espèces (Brunetti *et al.* 2015). De ce fait, leur statut indigène et non-indigène est incertain dans plusieurs régions où elles ont été décrites. Par exemple, *C. intestinalis* est présente sur une partie des côtes nord-américaines (ex. Nouvelle Ecosse, île du Prince Edward, etc.) où elle est considérée comme cryptogénique. Sa prolifération dans les parcs mytilicoles de cette région, notamment sur l'île du Prince Edward, ont amené un certain nombre d'auteurs à la considérer comme une espèce introduite et invasive (Ramsay *et al.* 2008, 2009). Néanmoins, l'aire de distribution amphi-atlantique disjointe de *C. intestinalis* pourrait également résulter de processus naturels historiques. De telles distributions ont en effet été observées chez plusieurs espèces d'invertébrés marins en Atlantique Nord (Haydar 2012). *C. robusta* est quant à elle considérée comme indigène du Pacifique Nord-Ouest, région à partir de laquelle l'espèce aurait été introduite dans toutes les autres régions de sa distribution actuelle connue. Néanmoins, ce statut d'espèce indigène en Asie est liée au lieu de sa description, qui est récente (1967).

Si *C. intestinalis* et *C. robusta* ont bien été introduites dans les différentes régions où elles ont actuellement ce statut, on devrait s'attendre à observer une forte diversité génétique des populations introduites à l'instar de ce qui a été observé dans 76% des études de génétique des invasions réalisées à ce jour (Rius *et al.* 2015). Cette observation est expliquée par une forte

pression en propagules (cf. introduction générale). Compte-tenu de la similarité de leurs traits d'histoire de vie et cycles de reproduction, on peut s'attendre à trouver une diversité génétique similaire entre les deux espèces. C'est par exemple le cas des populations introduites (ou supposées telles) de *C. robusta* et *C. intestinalis* étudiées par Zhan *et al.* (2012) en Amérique du Nord. Cette étude a été basée sur l'analyse d'un gène mitochondrial : la distribution des haplotypes par population pour les deux espèces (respectivement présentes sur la côte Ouest et la côte Est américaine) est présentée en Figure 5.1. Au contraire des résultats obtenus par Zhan *et al.* (2012), Roux *et al.* (2013) en utilisant un grand nombre de marqueurs nucléaires (i.e. les SNPs de 852 locus caractérisés par un séquençage complet du transcriptome) mais sur un petit nombre d'individus (i.e. 10 de chaque espèce) avait mis en évidence une diversité génétique plus faible de *C. robusta* par rapport à *C. intestinalis*. Cette étude suggérait des processus démographiques historiques différents entre les deux espèces. Ainsi, les résultats des comparaisons entre les deux espèces ne sont pas convergents entre les études. De plus, les effectifs par population ou/et les couvertures géographiques étaient limitées dans ces deux études; en particulier, aucune n'a examiné en détail les patrons de diversité génétique des deux espèces dans leur zone de sympatrie.

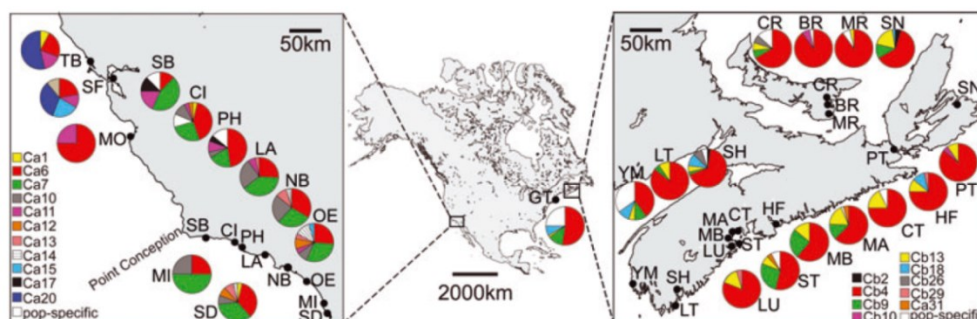


Figure 5.1. **Distribution des haplotypes mitochondriaux** basés sur la séquence codant pour une portion de la sous unité 3 de la cytochrome oxydase et de la sous unité 1 de la chaîne respiratoire (COX3-ND1) séquencés sur 493 individus de *C. intestinalis* (figure de droite) et 380 individus de *C. robusta* (figure de gauche) **le long des côtes nord-américaines**. Figure tirée de Zhan *et al.* (2012).

Par une approche de phylogéographie, cette partie de mon travail de thèse avait donc pour objectif d'analyser et de comparer la diversité génétique des deux espèces à une échelle mondiale afin d'établir leurs histoires démographiques et migratoires, me permettant également de (ré-)évaluer leur statut d'espèce indigène et non-indigène dans certaines régions où elles ont été décrites. Pour cela nous avons obtenu de nouvelles données moléculaires, en particulier dans l'aire de distribution supposée naturelle de *C. robusta* (région pour laquelle aucune donnée de génétique des populations n'était alors disponible) et avec un focus sur la zone de sympatrie. Nous avons choisi de travailler avec deux marqueurs mitochondriaux, malgré les défauts de ce type de marqueurs, pour pouvoir intégrer à notre échantillonnage, l'important jeu de données de Aibin Zhan et collaborateurs (2012), permettant d'avoir ainsi une large couverture géographique. Ce travail a débuté au début de ma thèse et s'est poursuivi tout du long en fonction des nouveaux échantillonnages obtenus (ex. Japon – Mai 2015). Ce travail fait l'objet d'un article présenté en section II et soumis à la revue *Scientific Reports*.

Les points clés de cet article sont résumés ci-après. Concernant l'échantillonnage, 501 individus de *C. robusta* et 683 individus de *C. intestinalis* ont été échantillonnés dans différentes régions à l'échelle mondiale dont respectivement 320 et 592 individus échantillonnés dans la zone de sympatrie. Les zones d'échantillonnages ont été : pour *C. robusta*, la mer Méditerranée, le Pacifique Sud-Est (Chili) et le Pacifique Nord-Ouest (Japon), la région où *C. robusta* est supposé indigène ; et pour *C. intestinalis*, l'Atlantique Nord-Ouest (USA) et la Mer du Nord (Suède). Ces individus ont été séquencés sur deux séquences mitochondriales : le locus COI (codant pour la sous-unité 1 de la cytochrome oxydase) classiquement utilisé pour des études de

phylogéographie et le locus COX3-ND1 (espaceur entre le gène codant pour la sous-unité 3 de la cytochrome oxydase et le gène codant pour la sous-unité 1 de la NADH deshydrogénase) utilisé par Zhan *et al.* (2012). Des estimations de la diversité génétique, la construction de réseaux d'haplotypes et une analyse bayésienne, testant un scénario de divergence entre les deux côtes atlantiques pour *C. intestinalis*, ont été réalisées pour évaluer l'histoire démographique et migratoire de ces deux espèces à l'échelle mondiale. Ces analyses ont été réalisées sur un jeu de données concaténées des deux séquences mitochondriales et sur le jeu de données contenant uniquement les séquences de COX3-ND1 pour inclure les données de Zhan *et al.* (2012).

Les résultats obtenus sur l'ensemble des échantillons collectés, et quelque soit le jeu de données utilisé (i.e. données concaténées et données incluant que les séquences de COX3-ND1) montrent que les patrons de diversité et de structure génétique sont contrastés entre les deux espèces (Figure 5.2). *C. robusta* présente une faible diversité génétique à l'échelle régionale et mondiale et une structure génétique marquée entre les régions échantillonnées. Au contraire, *C. intestinalis* présente une diversité génétique plus élevée mais plus homogène entre les deux côtes de l'Atlantique Nord. Ces contrastes de distribution de la diversité génétique entre les espèces sont particulièrement importants dans la zone de sympatrie.

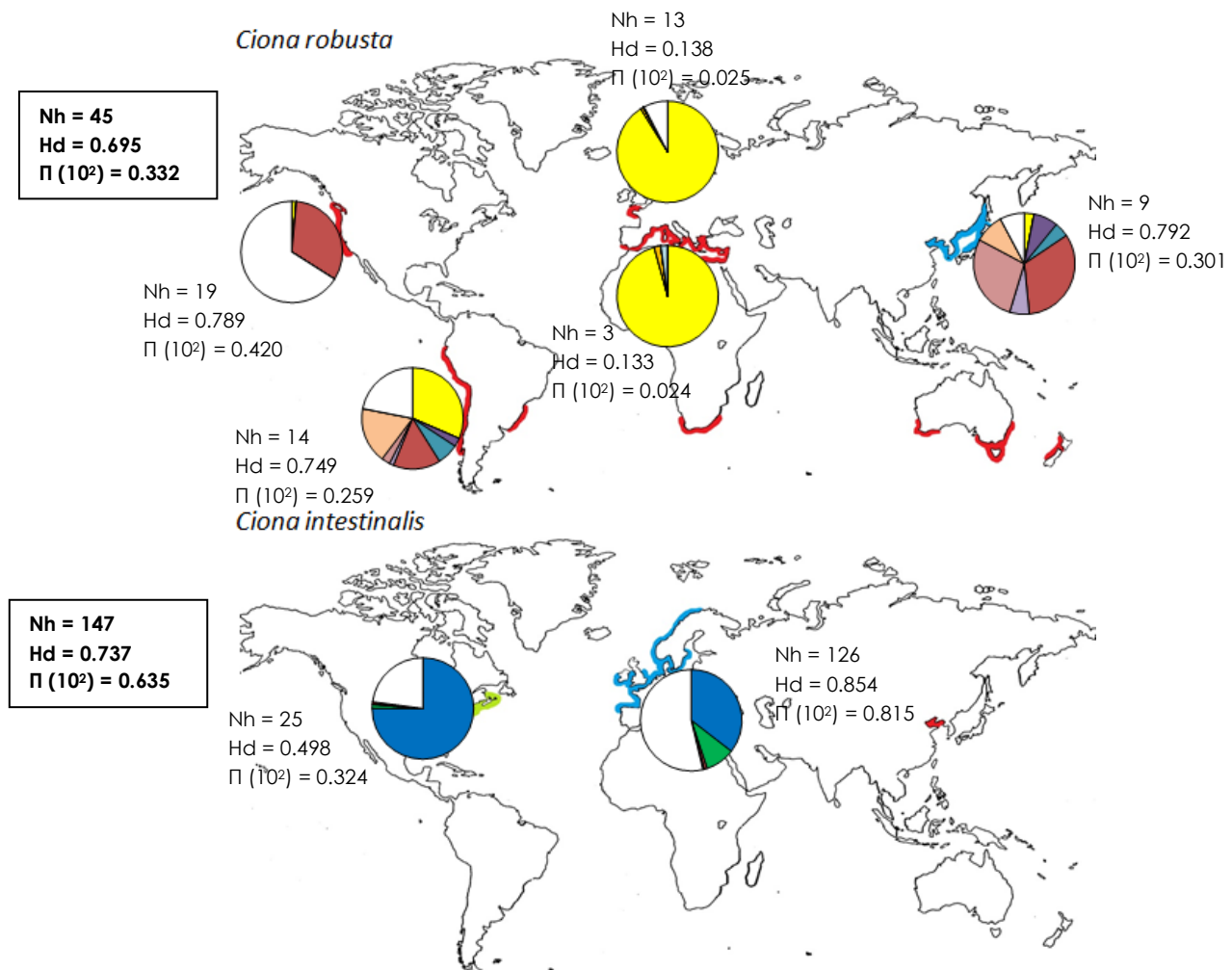


Figure 5.2. **Distribution des haplotypes mitochondriaux** basés sur les séquences COX3-ND1 obtenues au cours de cette étude et de celle réalisée par Zhan *et al.* (2012). Ces deux études regroupent les données obtenues pour 704 individus de *C. robusta* et 1140 individus de *C. intestinalis* **de différentes régions**. Les camemberts indiquent la proportion des différents haplotypes observés dans chaque région : une couleur correspond à un haplotype donné, excepté pour le blanc qui correspond à l'ensemble des haplotypes privés de chaque région. Le nombre total d'haplotypes (Nh), la diversité haplotypique (Hd) et la diversité nucléotidique ($\pi(10^2)$) sont donnés pour chaque région ainsi que dans les deux encadrés à gauche pour chaque espèce sur l'ensemble de l'étude.

Les différences observées sont en accord avec les observations de Roux et al. (2013) obtenues avec des séquences nucléaires. Ce résultat suggère une histoire démographique différente entre les deux espèces et l'existence d'un goulot d'étranglement* chez *C. robusta* postérieurement à la divergence des deux espèces (estimée à environ 4 millions d'années, durant le Pliocène).

Les résultats obtenus pour *C. robusta* suggèrent une histoire différente selon les régions avec 1) une très faible diversité génétique en Europe et 2) une forte diversité génétique dans les populations du Pacifique, par ailleurs génétiquement distinctes des populations européennes (Figure 2). La faible diversité génétique observée en Europe suggère un effet de fondation* lors de l'introduction ou un goulot d'étranglement très important après son introduction dans cette région. Cette hypothèse est cependant à moduler du fait que l'étude se limite à l'utilisation d'un marqueur mitochondrial sur lequel des effets sélectifs ou de balayages sélectifs peuvent être observés (Galtier et al. 2009). L'analyse de ces échantillons sur des marqueurs nucléaires serait à prévoir pour vérifier cette hypothèse. Néanmoins l'adéquation entre les données de Roux et al. (2013) et les données obtenues à l'échelle globale dans notre étude laisse penser que les éventuels effets sélectifs ne jouent pas un rôle dominant. Sous l'hypothèse de neutralité des marqueurs utilisés dans notre étude, la faible diversité génétique pourrait être le reflet de l'introduction très récente de *C. robusta* en Europe, au contraire de la situation rencontrée dans le Pacifique Est. En effet, dans les deux régions du Pacifique Est, nous avons observé le scénario classiquement attendu chez les espèces marines introduites et expliqué par des introductions répétées provenant de différentes populations sources. Le plus grand nombre d'haplotype privé observé dans le Pacifique Est suggère un temps de résidence ancien de l'espèce dans cette zone (ex. *Molgula manihantensis*, Haydar et al. 2011). De plus, la date de première observation de l'espèce (i.e. fin du 19^e siècle) dans cette zone étant plus ancienne que la description de *C. robusta* dans le Pacifique Nord-Ouest (i.e. milieu du 20^e siècle), il nous a semblé légitime de proposer que l'aire de distribution naturelle de cette espèce pourrait être la région du Pacifique Est et non le Pacifique Nord-Ouest (région où a été déposée l'holotype (Hoshino & Tokioka 1967)). L'utilisation de marqueurs nucléaires et d'un échantillonnage plus représentatif des deux zones étudiées (notamment du Pacifique Nord-Ouest) couplé à l'utilisation de modèle de migration pourrait nous permettre de mieux comprendre la relation de connectivité entre les deux zones.

Les résultats obtenus sur *C. intestinalis* amènent également à s'interroger sur son statut d'espèce non-indigène dans l'Atlantique Nord-Est, et renforce la proposition de l'appeler dans cette zone une espèce cryptogénique. En effet, la faible structure génétique et le partage des haplotypes dominants entre les deux côtes de l'Atlantique nord sont en faveur d'une introduction de *C. intestinalis* en Atlantique Nord-Ouest. Cependant le nombre important d'haplotypes privés et le résultat de l'approche bayésienne soutenant une divergence entre les populations des deux régions estimée à 27,222 années (95%CI : 13,518 et 40,291 ans) sont en faveur d'une distribution amphi-Atlantique naturelle disjointe de *C. intestinalis*. Cette situation pourrait être due à la recolonisation des deux côtes après le dernier maximum glaciaire survenu il y a environ 21,000 années, depuis des zones refuges situées de part et d'autre de l'Atlantique. De plus, deux espèces au statut taxonomique incertain sont trouvées dans la zone arctique et pourraient être des populations différenciées de *C. intestinalis* remettant en cause la distribution disjointe de cette espèce dans l'Atlantique Nord. Cette hypothèse d'une distribution amphi-atlantique est à vérifier en utilisant des marqueurs nucléaires et en utilisant des modèles de migration plus complexes, par exemple incluant des processus de migrations différentielles au cours du temps et entre les deux côtes. Nos observations n'excluent pas la possibilité d'évènements d'introduction actuels sur les côtes américaines depuis les côtes européennes, donc qu'un mélange d'évènements anciens et actuels aient conduit à l'établissement de *C. intestinalis* en Amérique du Nord.

II. Article 4

Contrasting global genetic patterns in two biologically similar, widespread and invasive *Ciona* species (Tunicata, Ascidiacea)

Sarah Bouchemousse^{1, 2*}, John D.D. Bishop³ and Frédérique Viard^{1, 2*}

¹ Sorbonne Universités, UPMC Univ Paris 6, UMR 7144, Station Biologique de Roscoff, Place Georges Teissier, 29680 Roscoff, France

² CNRS, UMR 7144, Equipe Div&Co, Station Biologique de Roscoff, Place Georges Teissier, 29680 Roscoff, France

³ Marine Biological Association, Citadel Hill, Plymouth PL1 2PB, UK

*Current address : UMR7144, Equipe Diversité et Connectivité dans le paysage marin Côtier (Div&Co), CNRS-UPMC, Station Biologique de Roscoff, 29680 Roscoff, France

Email: sarah.bouchemousse@sb-roscoff.fr; viard@sb-roscoff.fr

Soumis dans le journal Scientific Reports

Abstract

Understanding the pattern and process of anthropogenic spread of cosmopolitan or cryptogenic species is important for the management and prevention of biological invasions. Introduction histories are still poorly understood in two globally distributed invasive tunicates, *Ciona robusta* and *C. intestinalis*, which are sympatric in a restricted area of NW Europe. By gathering new mitochondrial sequences that were merged with previously published datasets, we analysed genetic patterns in different geographical areas 1) on their putative introduced ranges in America (*C. robusta* and *C. intestinalis*) and Europe (*Ciona robusta*) and 2) with a focus their sympatric range in the English Channel, where *C. intestinalis* is native. In the sympatric range, the two species display contrasting genetic diversity patterns, with low polymorphism in *Ciona robusta* supporting the prevalent view of a recent introduction in this area. Conversely, high polymorphism in *C. robusta* was found in the Eastern Pacific, suggesting multiple introduction events. For *C. intestinalis*, while genetic diversity indices support its recognized introduced status in the NW Atlantic, Bayesian analysis suggested a natural amphi-North Atlantic distribution, strengthening the cryptogenic status of this species.

Introduction

For centuries, species have been intentionally or accidentally transported beyond their native range by human activities (i.e. biological introduction¹). Human-mediated dispersal has radically altered species' distributions at a global scale, sometimes leading to cosmopolitan distribution (i.e. occupation of several biogeographic regions). When introduction of a given taxon commenced in the distant past, the identification of its native range can be difficult or even impossible, conferring cryptogenic status (i.e. the status of native or non-native cannot be defined²) over part or all of the species' range. Concomitantly, in recent decades, hidden diversity has been revealed by DNA-based studies and an increasing number of cryptic species (i.e. different species not morphologically distinguishable) have been reported in marine systems³. The discovery of cosmopolitan cryptic species further complicates the understanding of evolutionary and biogeographic history, their assignment as native or non-native and, for non-natives, their recent introduction history (e.g.^{4,5}).

These issues are exemplified by the class of Ascidiacea, in which more than 80% of known species were described during the last century and several have a worldwide distribution⁶. For instance, despite its status as a model organism for evolutionary and developmental biology⁷, molecular studies have only recently identified *Ciona intestinalis* (Linnaeus, 1767) as a species complex. Four cryptic species were first reported in the early 2000s⁸⁻¹⁰, among them *C. intestinalis* type A and type B. A recent taxonomic revision was carried out¹¹: the two taxa are now recognised as *C. robusta* Hoshino and Tokioka, 1967 and *C. intestinalis* (Linnaeus 1767). Several lines of evidence supported their status as separate species: 1) morphological evidence showed distinctive features between the two taxa¹¹⁻¹³, 2) genetic and genomic studies showed their strong evolutionary divergence (ca. 4 My BP^{14,15}) and a contemporary lack of introgression between the two taxa in their sympatric range^{8,15-18}. The two species are distributed worldwide^{7,10} (Fig. 1). They are well-established in artificial habitats including marinas and harbours and are important members of fouling communities^{19,20}. At a worldwide scale, *C. robusta* is presumed native to the NW Pacific and has been reported as an introduced species in the northern and southern hemisphere: in the Atlantic, Oceania, Mediterranean Sea and North and South Pacific oceans (Fig. 1a). *C. intestinalis* is generally considered native to the NE Atlantic, non-native or cryptogenic in the NW Atlantic (e.g.^{17,21}) and introduced in the Bohai and Yellow Seas, China¹⁰ (Fig. 1b). The western English Channel and South of Brittany (hereafter named EC), in the NE Atlantic, is the only area confirmed so far where the two species live in sympatry and even in syntopy^{16,18}, although the Bohai and Yellow Seas are a second possible area^{9,10} (Fig. 1b). As highlighted above, even in their range of sympatry, extremely rare interspecific gene flow is occurring in the wild with only few F1-hybrids observed¹⁶. The low introgression rate observed is more likely the outcome of historical gene flow (due to secondary contact 4-15 KY ago) between the two species¹⁵ than contemporary hybridizations in the wild (S. Bouchemousse, C. Haag-Liautard, N. Bierne, F. Viard, unpublished data). However, the demographic and introduction histories of these congeners are still largely undetermined, a prerequisite to understand their contemporary distribution patterns and future on a global scale^{22,23}.

Several studies have considered the phylogenetic relationship within the genus *Ciona* or the *C. intestinalis* species complex, (e.g.^{10,14}), or investigated genetic diversity and connectivity of local populations (e.g. in North America²⁴, in South Africa²⁵, and in the Mediterranean Sea²⁶). None of these examined in detail the global genetic patterns of the two species comparing different regions of introduction and the single sympatric area described so far, wherein the two species live in syntopy (i.e. in the same habitat) and thus grow in the same environmental conditions. In addition, the two species display similar life history traits and life cycles and, being congeners, phylogenetic constraints are limited. They are thus perfect case studies to compare native and

non-native genetic patterns (i.e. without phylogenetic or environmental constraints). Here, we carried out genetic studies using sequence data obtained with two mitochondrial markers to investigate the genetic patterns of *C. robusta* and *C. intestinalis*. Merging our data with published information²⁴, we compared the genetic patterns of the two species at a global scale. We hypothesize that non-native populations should display different features according to the time elapsed since their introduction; for instance, populations in recently invaded areas should be less genetically diversified as compared to areas with ancient introductions (because of a reduced number of introduction events and thus founders). *C. robusta* is presumed to be a recent introduction in Europe (in the 2000s¹⁸) but older in the NE Pacific (1910s or 1930s, references in¹⁰) while the age of the introduction is unknown in the SE Pacific although *C. intestinalis* was recorded in Chile in 1885²⁷. In addition, we hypothesize that both historical and contemporary processes (e.g. introduction, connectivity etc.) should have influenced observed patterns of genetic diversity and we tested this hypothesis by contrasting the putative introduced and native ranges of *C. intestinalis*. Altogether, we aimed to re-evaluate the recent history and cryptogenic status of the two species in the study areas.

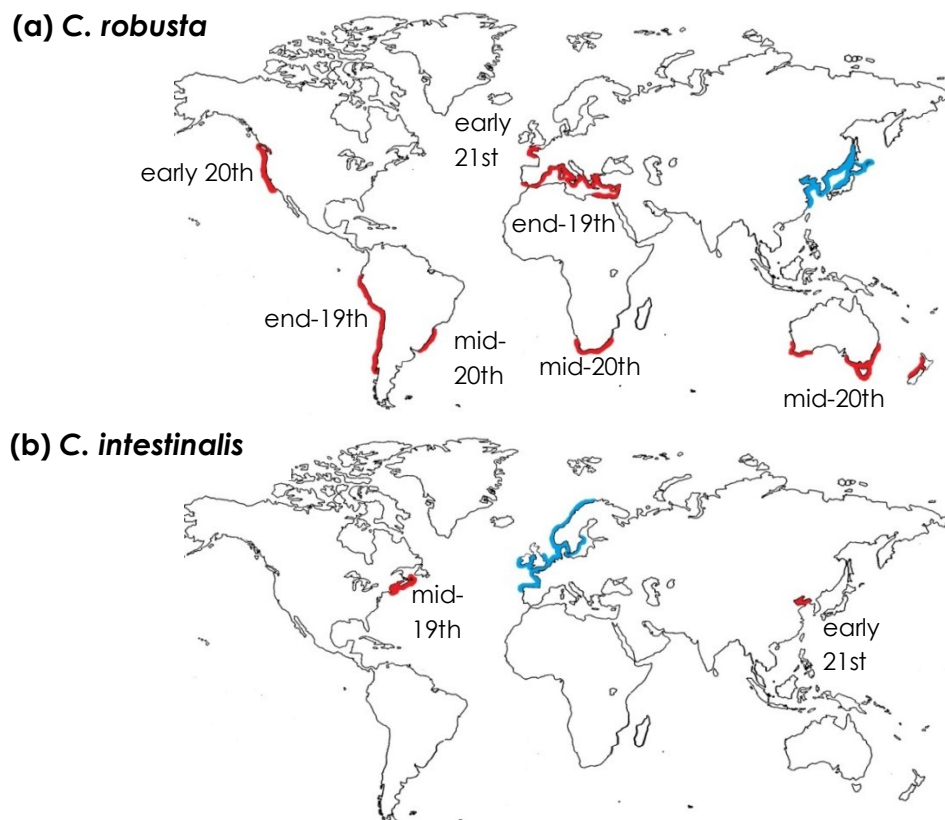


Figure 1. Worldwide distribution of *Ciona robusta* (a) and *C. intestinalis* (b) based on literature records.

Areas where the species are recognized as native and as non-native or cryptogenic (i.e. undefined status) are in blue and red respectively. Approximate period of the first report of *Ciona* species (known as *C. intestinalis* before revision of Brunetti et al. (2015)) is given for each geographical region. Figure adapted from Procaccini et al.⁷, Caputi et al.⁹ and Carver et al.²¹ (with references therein).

Results

Diversity analyses across species and populations

Concatenated dataset. Totals of 501 individuals of *C. robusta* and 683 individuals of *C. intestinalis* sampled for this study (Fig. 2 for details of sampling sites) were successfully sequenced on two mtDNA fragments (COI and COX3-ND1). Due to the non-independence of the two mitochondrial loci, statistical analyses were carried out on concatenated sequences with a total of 1404 base pairs (bp) for *C. robusta* and 1313 bp for *C. intestinalis*.

Based on the dataset from the concatenation of the two mtDNA fragments, very high polymorphism was observed over the two species but *C. robusta* was clearly less polymorphic than *C. intestinalis*, with 48 haplotypes (63 segregating sites) and 255 haplotypes (227 segregating sites) for *C. robusta* and *C. intestinalis* respectively. As expected, the interspecific divergence was clearly higher (12.6%) than within species (*C. robusta*: 0.14%, *C. intestinalis*: 2.5%). Genetic diversity indices (Hd: haplotypic diversity and π : nucleotide diversity) are summarized per population in Figure 3. Detailed values and additional genetic diversity indices are provided in Table S1. Haplotype frequencies per population are available from the authors upon request.

For *C. robusta*, the introduced populations in the EC display the lowest haplotype diversity (mean per population, $Hd_{(mean)} = 0.265 \pm 0.232$) compared to populations of other geographical areas where the species has been introduced: $Hd_{(mean)} = 0.578 \pm 0.470$ in the Mediterranean Sea, and $Hd_{(mean)} = 0.897 \pm 0.066$ in the SE Pacific where highest population genetic diversity indices were found. The EC value is also far below that observed in its putative native range (NW Pacific: $Hd_{(mean)} = 0.810 \pm 0.050$). Some populations of the EC were even monomorphic (i.e. Cam and StM, Fig. 3) despite the extensive polymorphism of the markers used. The nucleotide diversity over all populations of the EC was also very low with a π value 12 times lower than in the NW Pacific, 11 times lower than in the SE Pacific and 2.5 times lower than the Mediterranean group. This low molecular diversity in the EC is well illustrated by the network, in which all the EC haplotypes are closely clustered in a star-like feature (1-3 mutation steps) around a central dominant haplotype, Ha1, shared by 85% of the EC individuals (Fig. 4a).

For *C. intestinalis*, genetic diversity was high in every population with an opposite trend to *C. robusta* in EC: the EC (native range of *C. intestinalis*) contributed most of the diversity observed in *C. intestinalis*, as shown by the high average Hd (0.960 ± 0.028), explained by a large proportion of private haplotypes in this region. Despite also being in the native range of *C. intestinalis*, the North Sea group was the least genetically diverse, with average values significantly lower than for the EC ($P < 0.01$, Mann-Whitney rank sum test for Hd and π). In Nahant, the single NW Atlantic population, presumed introduced, genetic diversity indices were intermediate between those two regions (Fig. 3). The high molecular diversity of the EC populations is shown by the median joining haplotype network (Fig. 4b). Interestingly, the network displayed a pattern different from *C. robusta*, with three star-like networks reflecting three genetic clusters (C1, C2 and C3 in Fig. 4b). Cluster C1 was represented by 74.7% of the individuals of the whole dataset, C2 by 19.9% and C3 by 4.7% (details per population are available in Table S2).

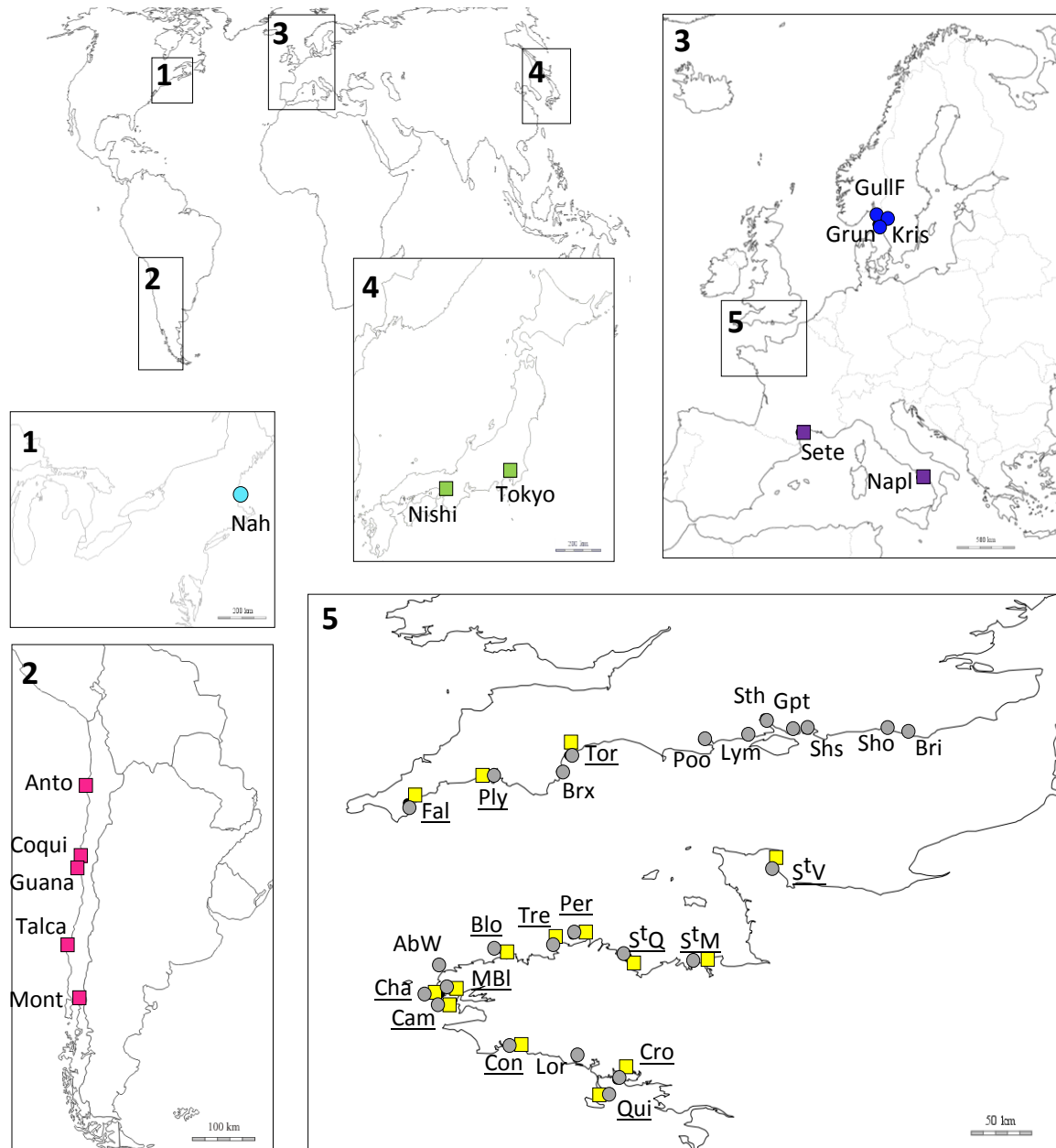


Figure 2. Sites of *Ciona robusta* and *C. intestinalis* sampled for this study (for population codes and sampling, see Table S1).

Square and circle symbols represent sampling of *C. robusta* and *C. intestinalis*, respectively. Underlined locality names indicate syntopic localities, i.e. where the two species coexist in the same habitat. Colors represent regions; the same color code is used to display genetic diversity indices per population (Fig. 3) and median-joining haplotype networks (Fig. 4 and 5). Note that the localities studied by Zhan and co-authors²⁴ are not indicated here but provided in Figure S1, with additional information in Table S3.

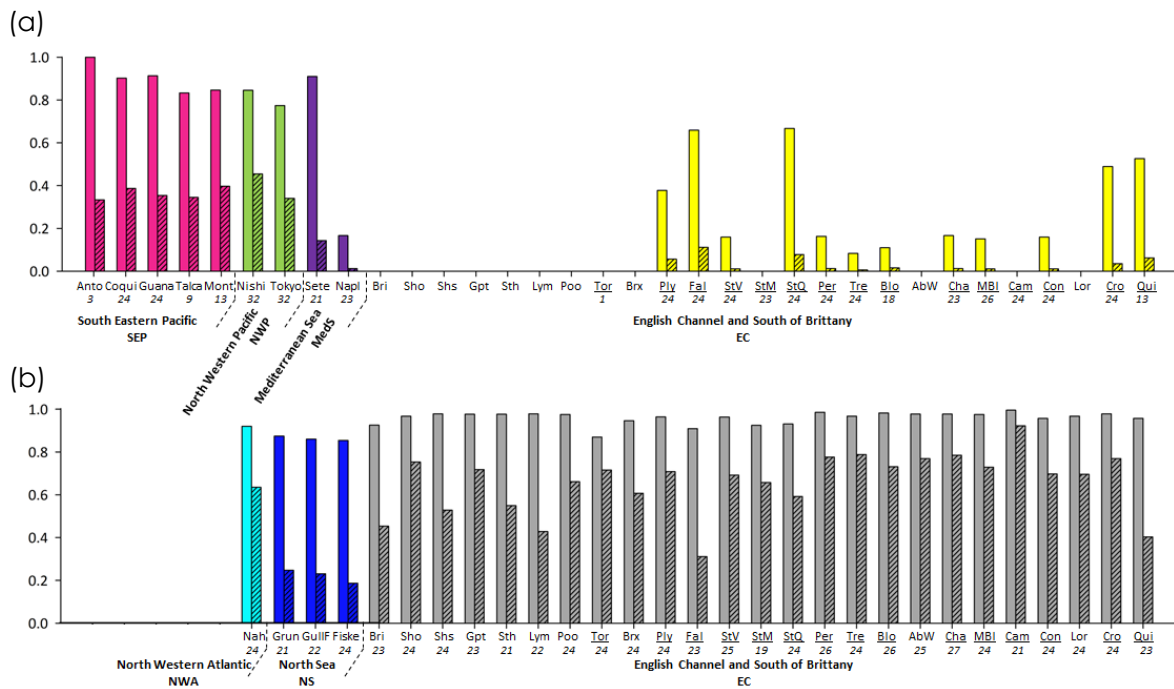


Figure 3. Haplotypic diversity (plain bars) and nucleotide diversity (value.10², hatched bars) computed over concatenated mitochondrial DNA sequences (COI and COX3-ND1) in each sampled population of *Ciona robusta* (a) and *C. intestinalis* (b).

The EC is the only sympatric region wherein the two species were reported. Underlined locality names indicate syntopic localities, i.e. where the two species coexist in the same habitat. Numbers of individuals sampled are in italics under the population codes. See Table S1 for population codes and additional genetic diversity indices and Table S3 for results using COX3-ND1 only but with wider sampling coverage (our data and previously published data of Zhan et al.²⁴).

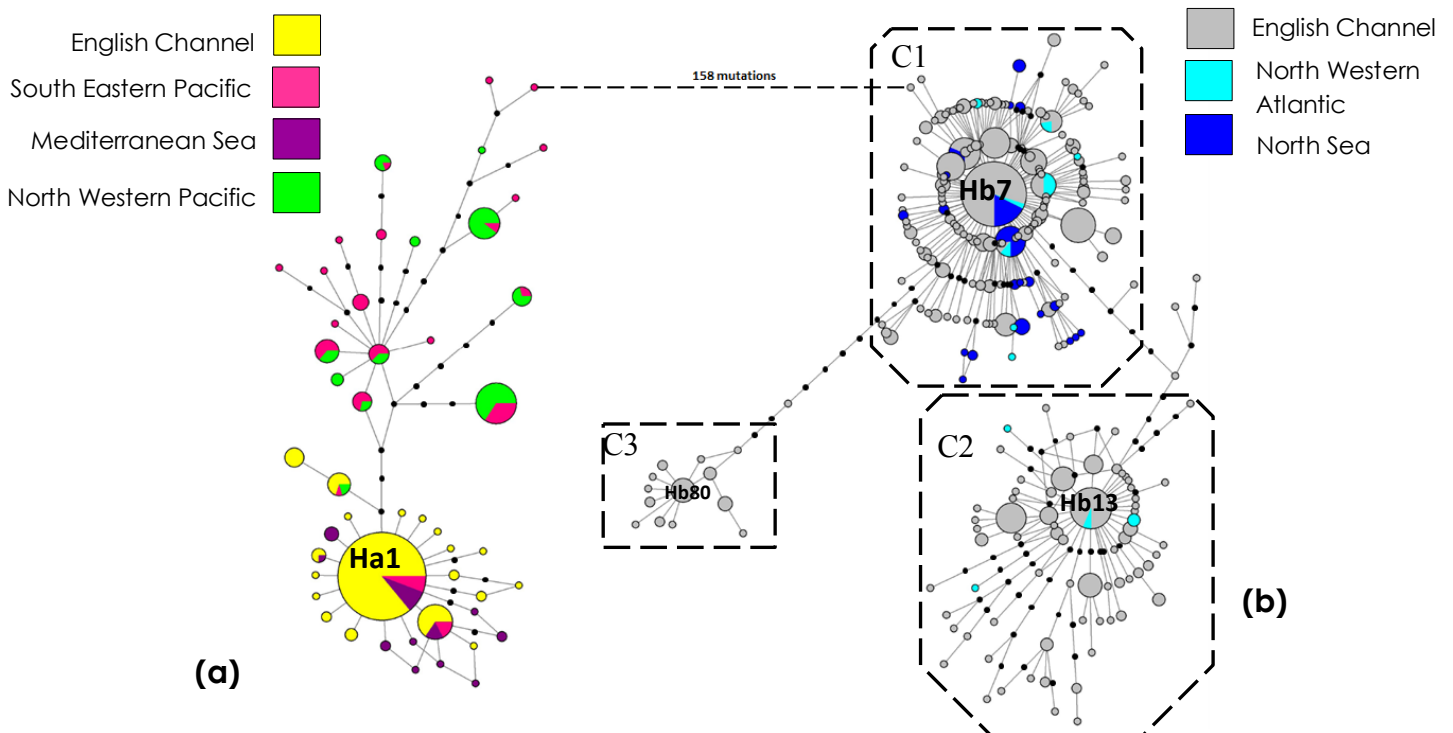


Figure 4. Median-joining haplotype networks of *Ciona robusta* (a) and *C. intestinalis* (b) based on concatenated mtDNA sequences.

Haplotype circles are proportional to haplotype frequency in the whole dataset. Branch lengths are proportional to number of mutational steps between two haplotypes. Missing haplotypes are indicated by small black circles. Colors represent the location of individuals possessing the haplotypes. A dotted line gives the number of mutations between the most similar haplotypes in the two species.

COX3-ND1 incorporating additional data. By merging our dataset with the published dataset of Zhan et al.²⁴ on Pacific and Atlantic coasts of North America (see Figure S1 for sampling), totals of 704 *C. robusta* and 1140 *C. intestinalis* individuals were examined on COX3-ND1 sequences of 667 and 576 bp respectively. Genetic diversity indices are summarized in Table 1 for each geographical area and in Table S3 for each population.

Regarding genetic diversity indices for *C. robusta*, all Pacific areas sampled were very similar ($H_d = 0.792$ for NW, $H_d = 0.749$ for SE and $H_d = 0.798$ for NE Pacific) regardless of their putative native or introduced status. These values contrast with the very low genetic diversity found in the EC and Mediterranean Sea ($H_d = 0.138$ and $H_d = 0.133$ respectively). The haplotype network showed two clusters (Fig. 5a): C1 incorporated all individuals from the EC and Mediterranean Sea, 91% of the individuals of the NW Pacific, 85% of the SE Pacific and 35% of the NE Pacific; and C2 included only the remaining individuals from the NE Pacific. For *C. intestinalis*, the EC area was significantly more genetically diverse ($H_d = 0.870$) than the North Sea ($H_d = 0.619$, $P < 0.01$, Mann-Whitney rank sum test) and the NW Atlantic ($H_d = 0.498$, $P < 0.001$). However, H_d was not significantly different between North Sea and the NW Atlantic ($P = 0.162$). The haplotype network of *C. intestinalis* showed the same topology as the concatenated dataset with the same three star-like clusters of haplotypes (Fig. 5b). Dominant haplotypes of the two major clusters (Cb4/9 and Cb38) were both shared by individuals of both Atlantic coasts.

Table 1. Regional genetic diversity indices of *Ciona robusta* and *C. intestinalis* based on COX3-ND1 sequences (source: this study and Zhan et al.²⁴).

Both mean per population and total are given for each region. Npop: number of populations with 18 or more individuals; Nind: number of individuals; Nh: number of haplotypes; H_d : haplotype diversity; π : nucleotide diversity. Genetic diversity indices per population are detailed in Table S3. Study localities are shown in Fig. 2 for the sites sampled for this study and in Fig. S1 for the sampling locations used by Zhan et al.²⁴.

Geographical area	Code	Npop	Mean per population (\pm SD)				Total per region			
			Nind	Nh	Hd	π (10^2)	Nind	Nh	Hd	π (10^2)
C. robusta										
Mediterranean Sea	MedS	2	44	2.50 (± 0.71)	0.137 (± 0.070)	0.024 (± 0.013)	44	3	0.133	0.024
English Channel	EC	13	306	1.92 (± 1.04)	0.128 (± 0.159)	0.023 (± 0.029)	320	13	0.138	0.025
North Eastern Pacific	NEP	6	149	6.83 (± 1.47)	0.774 (± 0.035)	0.397 (± 0.058)	203	19	0.798	0.420
South Eastern Pacific	SEP	2	48	6.50 (± 2.12)	0.725 (± 0.056)	0.266 (± 0.031)	73	14	0.749	0.259
North Western Pacific	NWP	2	64	6.50 (± 0.70)	0.792 (± 0.045)	0.301 (± 0.057)	64	9	0.792	0.301
Total							704	45	0.695	0.332
C. intestinalis										
North Western Atlantic	NWA	16	481	4.81 (± 1.83)	0.482 (± 0.188)	0.241 (± 0.228)	481	25	0.498	0.324
North Eastern Atlantic	NEA	28	659	10.68 (± 3.04)	0.815 (± 0.107)	0.732 (± 0.253)	659	126	0.854	0.815
English Channel	EC	25	592	11.24 (± 2.67)	0.839 (± 0.081)	0.793 (± 0.189)	592	117	0.870	0.854
North Sea	NS	3	67	6.00 (± 1.73)	0.608 (± 0.067)	0.223 (± 0.009)	67	13	0.619	0.232
Total							1140	147	0.737	0.635

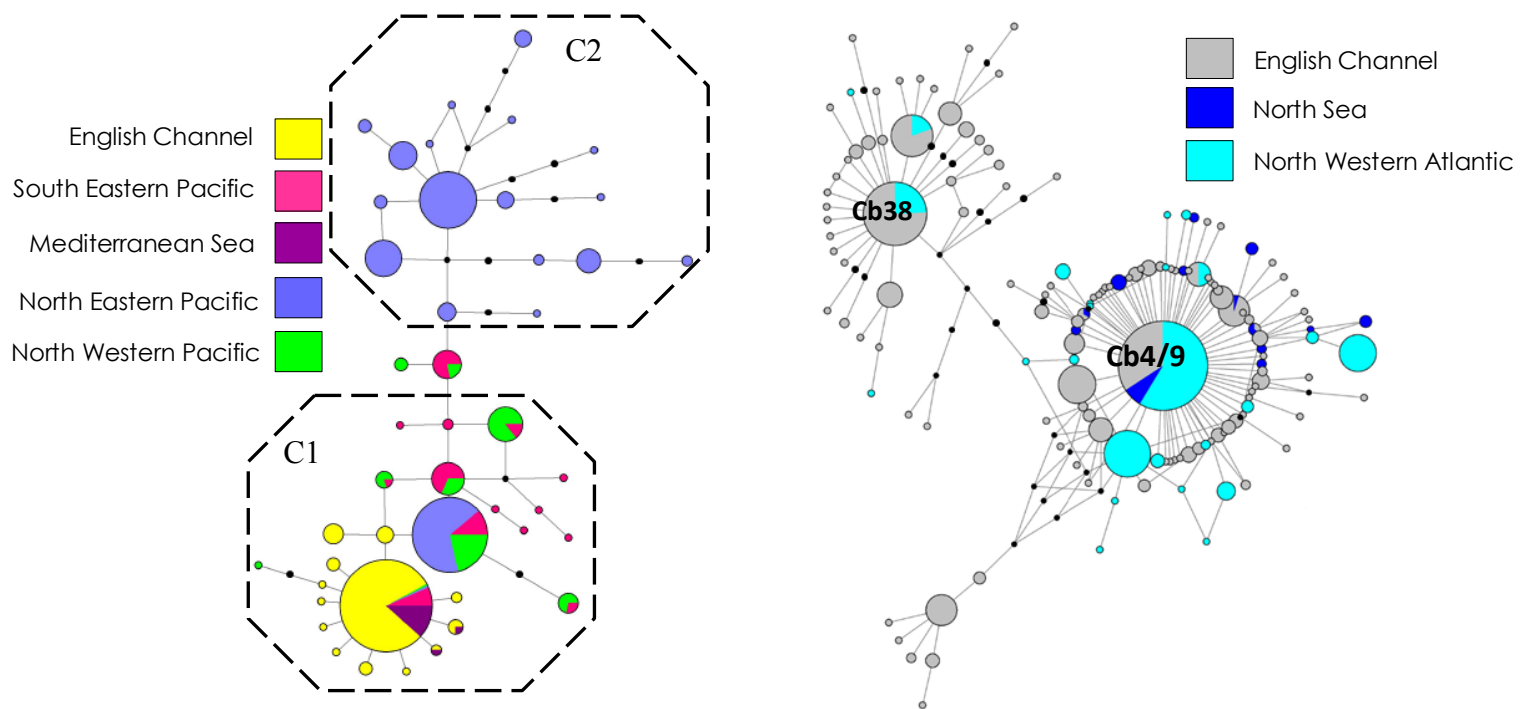


Figure 5. Median-joining haplotype networks of *Ciona robusta* (a) and *C. intestinalis* (b) based on COX3-ND1 sequences.

Data from this study and from Zhan et al.²⁴. Haplotype circles are proportional to haplotype frequency in the whole dataset. Branch lengths are proportional to number of mutational steps between two haplotypes. Missing haplotypes are indicated by small black circles. Colors represent the regions where the individuals possessing the haplotypes were found. Haplotypes with a name were defined in Zhan et al.²⁴.

Genetic structure

Concatenated dataset. For *C. robusta*, overall genetic differentiation among all populations was high and significant (Table 2). The hierarchical AMOVA showed a significant effect of geographical areas (ϕ_{CT}), while variation among populations within areas was smaller and non-significant (ϕ_{SC}) (Table 2). This is illustrated by the network in which many distant haplotypes are private to the SE Pacific (Fig. 4a). At the European level, Naples in the Mediterranean Sea and populations of the EC were not genetically different as indicated by pairwise ϕ_{ST} -values (Table S4a). Interestingly, despite the significant difference in pairwise ϕ_{ST} -values, populations of the SE Pacific and the NW Pacific were less divergent than with those of the EC and Mediterranean Sea. This finding was also well illustrated in the haplotype network by the high proportion of shared haplotypes between the two ranges: 33% of the haplotypes found in the SE and NW Pacific were shared between the two ranges.

As for *C. robusta*, the overall genetic structure among populations of *C. intestinalis* was significant (Table 2) with the effect of geographical areas (ϕ_{CT}) larger than the variation among populations within them (ϕ_{SC}), although both effects were significant in this case. Pairwise genetic distances (Table S4b) showed that the most differentiated populations were those from the North Sea. Altogether, the outcome of the genetic variance analyses is consistent with the network analysis showing no particular geographical partitioning of the three clusters (Fig. 4b; Table S2).

COX3-ND1 incorporating additional data. For *C. robusta*, the hierarchical AMOVA confirmed a large regional effect (ϕ_{CT} , Table 2), also illustrated by the network with a single haplotype (Ca1 in Fig. 5a) shared by the five geographical areas but at high frequency in the EC and Mediterranean Sea (90 and 95% respectively), moderate frequency in the SE Pacific (33%) and low frequency in the remaining ranges NW and NE Pacific (3.1 and 1.5% respectively). As for the concatenated dataset, AMOVA analyses did not show any significant genetic structure among populations

within areas (ϕ_{sc} , Table 2). For *C. intestinalis*, as with the concatenated dataset, the overall genetic differentiation was significant among populations (ϕ_{st} , Table 2) and the hierarchical AMOVA showed a significant effect of geographical area (ϕ_{ct}) and of populations within them (ϕ_{sc}).

Table 2. Hierarchical analysis of molecular variance for *Ciona robusta* and *C. intestinalis*.

Analyses were done using the concatenated mtDNA dataset and COX3-ND1 dataset only. ϕ_{ct} , ϕ_{sc} and ϕ_{st} refer to the fixation index measuring genetic differences among areas, among populations within areas and among all populations, respectively. Probability values ($H_0: \phi=0$) are indicated in brackets.

	Fixation index	concatenated dataset	COX3-ND1 dataset
<i>C. robusta</i>	Groups	SEP, NWP, MedS and EC	SEP, NEP, NWP, MedS and EC
	ϕ_{ct}	0.504 ($P < 0.001$)	0.476 ($P < 0.001$)
	ϕ_{sc}	0.005 ($P = 0.084$)	0.004 ($P = 0.502$)
	ϕ_{st}	0.507 ($P < 0.001$)	0.474 ($P < 0.001$)
<i>C. intestinalis</i>	Groups	NS and EC	NS, NWA and EC
	ϕ_{ct}	0.125 ($P < 0.001$)	0.154 ($P < 0.001$)
	ϕ_{sc}	0.071 ($P < 0.001$)	0.035 ($P < 0.001$)
	ϕ_{st}	0.147 ($P < 0.001$)	0.140 ($P < 0.001$)

Bayesian inference of divergence time for *C. intestinalis* in N Atlantic

Results of the Isolation with Migration Model (IMM) used for *C. intestinalis* to evaluate the time of divergence between NW Atlantic and NE Atlantic are provided in Figure 6, showing the median value and the 95% highest posterior density (95HPD) of each parameter, and Figure S2, showing the marginal posterior distribution of each parameter. Under IMM, the time of divergence between NW Atlantic and NE Atlantic was estimated around 27,222 yrs BP (95HPD: 13,518 – 40,291; Fig. 6). Concerning the migration model, only one model could not be rejected with an asymmetric migration, suggesting substantial gene flow from NE to NW Atlantic but not from NW to NE Atlantic.

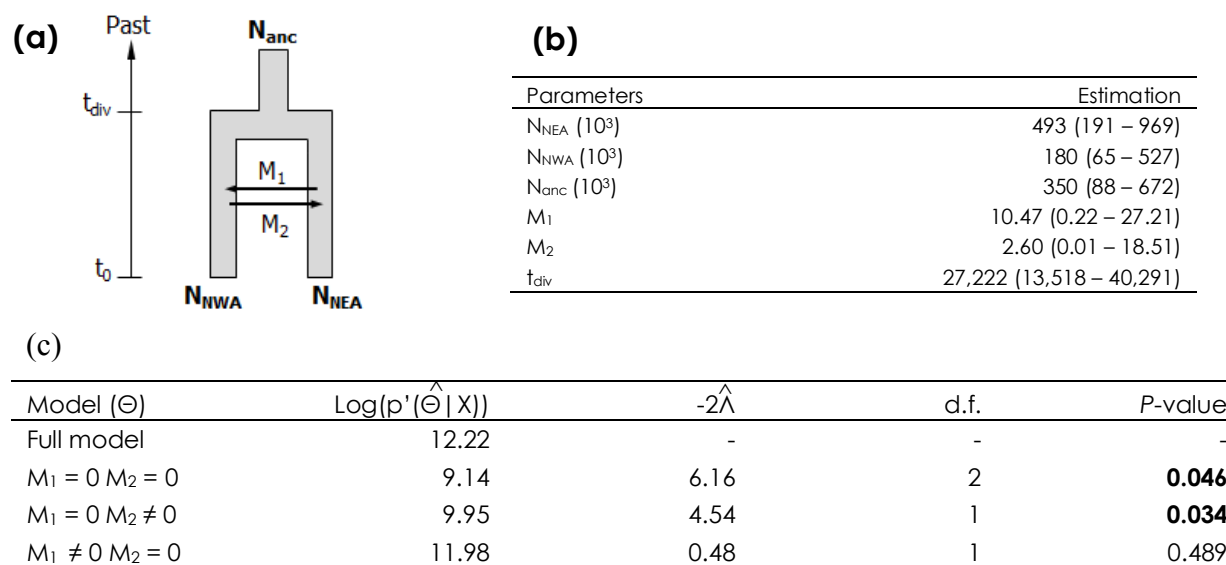


Figure 6. Demographic and divergence parameters estimated under isolation with migration model for *Ciona intestinalis*.

(a) Diagram of the population splitting events (see Table 1 for codes of geographical areas). Time axis is not to scale. (b) Estimates of times of divergence and demographic parameters for the two studied regions using COX3-ND1 sequences. N_{anc} , N_{NEA} , N_{NWA} : effective population size; M_1 and M_2 : number of migrants per generation; t_{div} : time since divergence. Median value and the 95% highest posterior density (95 HPD) of each parameter are given. (c) Tests for the migration model; $\text{Log}(p'(\hat{\Theta} | X))$: log of the highest posterior density of each model; $-2\hat{\Delta}$: likelihood ratio; d.f.: degrees of freedom; and P-value.

Discussion

Whatever the dataset, contrasting patterns were observed in *Ciona robusta* and *C. intestinalis*. Altogether, *C. robusta* displayed lower genetic diversity at population and regional levels, but marked spatial genetic structure as indicated, for instance, by private haplotypes in the NE Pacific (although not between the NW and SE Pacific). In contrast, *C. intestinalis* showed high genetic diversity and a more homogenous genetic structure in the North Atlantic. These contrasting patterns are even more pronounced in the sympatric area (i.e. EC): very low genetic diversity was observed in *C. robusta*, while *C. intestinalis* encompassed the whole genetic diversity observed at the species level in our study. These distinct genetic patterns in the two congeners are discussed in turn below, in light of their known historical and contemporary distributions.

The interspecific genetic divergence between *C. robusta* and *C. intestinalis* calculated using the mtDNA concatenated dataset was 12.6%, agreeing with previous studies using mitochondrial data (12.2% based on COI¹⁴, 15.9% based on COX3-ND1²⁴), as well as transcriptomic data (14.4% based on synonymous sequence divergence¹⁵). However, only Roux and coauthors¹⁵ previously recorded lower polymorphism in *C. robusta* compared to *C. intestinalis*. They analyzed few individuals and localities of the two species, but at the genome level. We here confirm this global pattern with a mitochondrial marker, using a wider geographical coverage and more extensive population sampling, with the addition of two regions of introduction (SE Pacific, EC) and the native range of *C. robusta* (NW Pacific). mtDNA markers can be sensitive to selective effects²⁸. However, results from our mitochondrial dataset were congruent with those obtained using 852 nuclear loci isolated from full transcriptomes¹⁵. Thus, although it should not be neglected, the role of selection seems moderate compared to other evolutionary forces, for instance drift. Decreased genetic diversity in *C. robusta* could be attributable in part to bottlenecks associated with introduction processes (see below), but not entirely: similar interspecific distinctions were apparent when comparing the genetic diversity of *C. robusta* and *C. intestinalis* in their native ranges (the NW Pacific and NW Atlantic, respectively). What can explain such a difference between two congeneric species that share common life-history traits and ecological properties? A plausible hypothesis is the existence of a historical demographic (and then genetic) bottleneck in *C. robusta* after its divergence and isolation from *C. intestinalis* (estimated ca. 4 My BP during the Pliocene^{14,15}) but before its anthropogenic global spread. This hypothesis can feasibly be related to several glacial and interglacial episodes since the divergence between the two species, and severely impacted the distribution ranges of other marine species^{29,30}.

C. robusta has a worldwide distribution and our results suggested a complex migration and demographic history. The areas we studied have all been regarded as non-native regions except the NW Pacific, considered the native range of *C. robusta*¹¹. Based on the COX3-ND1 dataset, thus taking advantage of the full sampling available, we could divide the current range of *C. robusta* into two categories: i) regions of high genetic diversity (all those sampled in the Pacific) and ii) regions of low genetic diversity (the EC and Mediterranean Sea). Most Pacific populations are genetically distinct from European areas, in particular those in the NE Pacific, which exhibit a high number of private haplotypes (Fig. 5a). High levels of genetic diversity have often been reported in non-native populations of marine invertebrates²³, including non-native ascidians^{31,32}. This is explained by repeated introductions from diverse sources by poorly controlled vectors, for instance maritime traffic³³. This hypothesis is well supported by the patterns observed in the NE Pacific with the existence of haplotypes spread over two distinct clusters of the haplotypic network (Fig. 5a) and the highest nucleotide diversity, thus suggesting local admixture between genetically divergent lineages. This may be explained by at least two genetically different sources for the introduction of *C. robusta* along the coasts of NW America. Such genetic mixing has already been described for *C. robusta* in South Africa²⁵. However, it is noteworthy that the two localities

examined in Japan also displayed divergent haplotypes as measured by nucleotide diversity (Table 1; Table S3) and shown by the network, with haplotypes within C2 and in the transition between C1 and C2. We thus cannot exclude an alternative explanation of a massive introduction from a single native population in which the two genetic lineages C1 and C2 already co-existed. This is the first population dataset to document the genetic diversity in native range of *C. robusta*. Our sampling of the native range is however not extensive enough to locate putative source populations and examine these alternative hypotheses. SE Pacific and NW Pacific populations were poorly differentiated (Table S4a) and shared numerous haplotypes (Fig. 4a and 5a). This suggests that SE Pacific populations were introduced directly from the NW Pacific, and not through secondary introduction. This relies on the commonly accepted assumption that NW Pacific is the native range of *C. robusta*¹¹. However, because of prolonged taxonomic uncertainty and its recent recognition, *C. robusta* could be viewed as a species whose native range is unknown. An alternative explanation is that *C. robusta* is actually native to the SE Pacific and introduced in the NW Pacific. Two lines of evidence may favor this hypothesis: in the SE Pacific, the high number of private haplotypes and haplotype genealogy suggest long-term residence of *C. robusta* in this region³⁴. In addition, the presence of the nominal species *C. intestinalis* in Chile was reported as long ago as 1885 (Trausted³⁵ cited in Castilla and co-authors²⁷): this is one of the first records of the nominal species *C. intestinalis* outside the NE Atlantic (Fig. 1a; note that *C. robusta* was only described in 1967). If SE Pacific *C. robusta* populations are introduced, the high level of genetic diversity suggests that, as for NE Pacific, the introduction originates from genetically differentiated sources. Repeated introductions (i.e. a propagule pressure scenario²³) are likely considering the time elapsed since the introduction of the species along the Pacific coasts of N and S America (early 20th and end of 19th Century, respectively^{24,27}). Another interesting finding is that Chilean populations share haplotypes with NE Atlantic populations (e.g. Ha1 haplotype in Fig. 4a), suggesting that they may have the same introduction sources or that recent EC populations have been seeded by Chilean populations. It is noteworthy that, despite their remoteness, Chile and EC share several non-native species, e.g. the tunicate *Asterocarpa humilis*, the bryozoan *Bugula neritina*, the mollusc *Mytilus galloprovincialis*, the green alga *Codium fragile fragile* (cited as *C. fragile tomentosoides* in Castilla et al.²⁷) and the red alga *Polysiphonia morrowii*³⁶⁻³⁸; Europe also hosts introduced species considered native to Chile, e.g. the tunicate *Corella eumyota*³⁹ and the mollusc *Crepidula dilatata*⁴⁰.

In contrast to the Pacific, European *C. robusta* populations showed very low genetic diversity. It is unlikely that this pattern arose by an introduction from a single source with limited genetic diversity because 1) this scenario is rarely observed in marine invertebrates as pointed out above and seems unlikely when considering the high diversity reported for *C. robusta* in other areas of introduction (e.g. NE Pacific), 2) populations from Japan are locally genetically diversified, as expected for marine invertebrates with large population size. It is thus more likely that introduction into Europe was accompanied by a severe founder event. This hypothesis is plausible given the very recent recognition of *C. robusta* in Europe (Fig. 1a). Bottleneck events following introductions were previously suggested for ascidians introduced into Europe, e.g. *Corella eumyota* and *Perophora japonica*^{39,41}. Bottleneck events are rarely observed in marine invertebrates²³, but the patterns observed are consistent with the hypothesis that *C. robusta* represents an early stage of colonization in Europe. Besides these "neutral scenarios", we cannot exclude "adaptive scenarios" for instance involving selection on standing genetic variation (and consequent reduction in genetic diversity) which is one of the evolutionary outcomes of introductions of genetically diversified individuals²³. A selective sweep in European populations of *C. robusta* could explain our findings based on mitochondrial loci²⁸. However, this hypothesis is unlikely because similar results (i.e. low genetic diversity of *C. robusta* populations in Europe as compared to NE Pacific) were reported by Roux et al.¹⁵ with nuclear loci derived from full transcriptomes. It would be informative to analyze our samples with nuclear markers with a high genome coverage, not only to confirm patterns of lower genetic diversity in European populations compared to Pacific, but also to improve our understanding of the evolutionary processes²³ that

shaped the populations following their introduction in the E Pacific and NE Atlantic, as recently undertaken for other marine invaders⁴²⁻⁴⁴.

In the sympatric range (i.e. the English Channel and south of Brittany), the genetic diversity of *C. intestinalis* is clearly higher than that of *C. robusta*. The values for *C. intestinalis* are typical of mtDNA markers in marine invertebrates in their native range (e.g.^{45,46}). The polymorphism of *C. intestinalis* is also highlighted by the molecular divergence between the haplotypes found in Europe: three divergent haplotypic clusters were identified in both mitochondrial datasets (Fig. 4b and 5b). The lack of agreement between gene genealogies and geographical partitioning of these haplotypes is best explained by a phylogeographic scenario of divergence in allopatry (for instance in southern and northern refugia) followed by secondary contacts and high gene flow, as documented in the N Atlantic in several marine species⁴⁷. In a previous study of patterns of marine species' distributions in the N Atlantic, Haydar⁴ categorized *C. intestinalis* as possessing a disjunct distribution, being present on both E and W coasts of Atlantic but absent from the intervening Arctic coastal regions (i.e. Spitzbergen, Iceland, Greenland and northern Canada). The status of this species was accordingly classified as cryptogenic, its presence on both temperate coasts being attributable with certainty to neither natural nor anthropogenic dispersal. As an alternative to anthropogenic dispersal, on-going natural dispersal across the Atlantic seems unlikely for organisms such as *C. intestinalis* spp. which have a brief planktonic phase⁴⁸, but a naturally disjunct distribution could arise from recolonization of NW Atlantic coasts from glacial refuges, as has been suggested for the gastropod *Littorina littorea*, a species also reported as a non-native in N America^{49,50}. Based on the COX3-ND1 dataset for *C. intestinalis*, four haplotypes shared by populations on both N Atlantic coasts were found at medium and high frequencies, one being dominant in all populations (Cb4/9, Fig. 5b). Additionally, weak regional genetic structure was found (Table 2). Disjunct distribution, shared dominant haplotypes and weak genetic structure are arguments in favor of an introduction of *C. intestinalis* from the NE into the NW Atlantic. On the other hand, most of the haplotypes are private to American populations (84%) or to European populations (96%). Private haplotypes are often considered characteristic of long-term population establishment⁴⁹, consistent with the alternative hypothesis of *C. intestinalis* being native to both sides of the N Atlantic. A similar situation has been described for the ascidian *Cnemidocarpa mollis*⁴. Bayesian inferences computed under Isolation with Migration Model (IMM) better supported the latter hypothesis of divergence from a common ancestor (Fig. 4b): the estimated time of divergence, within an interval of 13,518 to 40,291 yrs BP, excludes contemporary events. These dates are meaningful when considering the Last Glacial Maximum (LGM; 21ky BP) of the Pleistocene period as a major driver of distribution range shifts⁴⁷. The isolation between the two populations does not exclude additional contemporary migrations. It is thus possible that both historical population splitting and human-mediated introductions have occurred, at different times, across N Atlantic, explaining the present genetic features and ecological reports documenting a sudden expansion of *C. intestinalis* in the Maritime Provinces of Canada in recent decades⁵¹⁻⁵³. It is also important to note that under IMM, migration rates are constant through time, an assumption rarely met in nature, particularly for introduced species. More complex models assuming differential migration rates over time should be developed to evaluate more fully the status of *C. intestinalis* across the N Atlantic. It is noteworthy that *C. intestinalis* individuals were recently found in Iceland (SB, personal observation, 2014) suggesting that the amphi-Atlantic distribution is not so clearly interrupted in the most northern areas of the N Atlantic. In this context, we note that *C. intestinalis* is largely replaced by two taxa of uncertain taxonomic rank along Arctic coasts, *C. gelatinosa* Bonnevie, 1896 and *C. longissima* Hartmeyer, 1899. These were regarded as forms, varieties or subspecies of *Ciona intestinalis* by several authors, e.g.⁵⁴⁻⁵⁸, but were listed as full species by Sanamyan⁵⁹. They have not been included in recent molecular clarifications of inter-relationships of Atlantic and global *Ciona* populations. If *C. gelatinosa* and *C. longissima* were found to be infraspecific entities within *C. intestinalis*, this species would have a continuous amphi-Atlantic distribution (see Fig. 8 in Dybern⁶⁰), favouring the categorization of

populations on both the E and W coasts as native according to the logical framework of Haydar⁴. Examining specimens preserved in museums and analyzing populations from natural habitats, rather than artificial ones, and from Arctic localities could be helpful to further assess the status of *C. intestinalis* in the NW Atlantic. Altogether, considering these conflicting results and literature data, the cryptogenic status of *C. intestinalis* is strengthened, in light of the numerous cryptogenic species presenting similar complex patterns⁴.

Despite the complexity of reconstructing the eco-evolutionary history of cosmopolitan and cryptogenic species that have possibly been exploiting human-made habitats and vectors for a long time, this study showed that mtDNA-based studies and Bayesian inference can be helpful in documenting contrasting features 1) between congeners at a global scale, here supporting previous nuclear-based results suggesting a historical bottleneck in *C. robusta*, and 2) between different regions of introduction, indicating a relationship between age of introduction and genetic patterns observed. Considering that these two congeners display similar biological features but contrasting genetic patterns, this study highlighted the importance of human mediated dispersal and population demographic events in determining genetic patterns, apparently over-riding any influence of life history traits. These data also provide new hypotheses regarding the native vs. non-native status of the two study species in various parts of their ranges. Analyses of Arctic populations of *Ciona* sp. to assess the relationship of *C. intestinalis* populations on the two sides of the N Atlantic and additional studies in the presumed native range of *C. robusta* are priorities for further advancing the enquiries reported here.

Materials and Methods

Sampling and DNA extraction. *Ciona robusta* and *C. intestinalis* populations were sampled in 25 sites of the EC (in most of which the two species were found living in syntopy, Fig. 2 and Table S1 for details) and in 13 sites located in regions where only one of the two species has been reported so far (i.e. allopatric areas, Fig. 2). In detail, *C. robusta* individuals were collected in 14 marinas in the EC, five locations in the SE Pacific (Chile), two in the putative native range, the NW Pacific (Japan), and two in the Mediterranean Sea. Note that to our knowledge, this study is the first to sample a substantial number of individuals from the putative native range of *C. robusta* to carry out population genetic analyses. *C. intestinalis* individuals were collected in 25 marinas in the EC, three locations in the Skagerrak (North Sea region) and one in NW Atlantic (North America). Sampling was generally realized under floating pontoons, either using SCUBA diving or by collection from the surface from pontoon floats, hanging ropes and the underside of buoys. Around 24 individuals were sampled in each population with few exceptions (Table S1 for details). For each individual, a piece of branchial basket was preserved in 100% ethanol for genetic analyses. DNA extraction was performed with a Nucleospin® 96 Tissue Kit (Macherey-Nagel, Germany) according to the manufacturer's protocol.

Sequencing procedure. Two mitochondrial loci (hereafter named mtDNA), cytochrome oxidase subunit I (COI) and cytochrome oxidase subunit 3 - NADH dehydrogenase subunit I (COX3-ND1), were chosen to allow comparisons with previous datasets^{10,24}. The COI fragment was amplified using primer sequences and protocols obtained from Nydam and Harrison¹⁴. The COX3-ND1 fragment was amplified using TX3F and TN1R primers following the PCR protocol described in Iannelli et al.⁶¹. Sequencing reactions, run on an Applied Biosystems™ AB3730XL DNA sequencer after purification on ExoSAP-it®, were performed at Centre National de Séquençage-Genoscope (Evry, France) or the LGC Genomics platform (Berlin, Germany). All PCR products were sequenced in both directions. Sequences obtained were edited using CodonCode Aligner v.4.0.2 (CodonCode Corporation, MA) and aligned using BioEdit v.7.1.9⁶². For COI, a final alignment length of 737 base pairs (bp) was obtained for each species. For COX3-ND1, the final alignment

was 667 bp for *C. robusta* and 576 bp for *C. intestinalis*. Nucleotide sequences were translated into amino acid sequences using the Ascidian mitochondrial genetic code implemented in DnaSP v.5.10.01⁶³.

Statistical analyses. Due to the non-independence of the two mitochondrial loci, statistical analyses were carried out on concatenated sequences with a total of 1404 bp for *C. robusta* and 1313 bp for *C. intestinalis*. Note that similar results (in terms of genetic diversity and structure) were obtained independently when the two loci were analyzed separately (data not shown). For each species and each population, the number of haplotypes (Nh), the number of polymorphic sites (S), the haplotype diversity (Hd) and the nucleotide diversity (π) were computed using DnaSP⁶³. To compare populations, haplotype richness, which corrects for unequal sample sizes using a rarefaction procedure (rarefaction size of 18 individuals for *C. robusta* and 19 for *C. intestinalis*), was estimated with CONTRIB⁶⁴. For each species, median-joining networks were generated to infer the most parsimonious phylogenetic relationships among concatenated mtDNA haplotypes using NETWORK v.4.6 (www.fluxus-engineering.com).

Analyses of genetic structure were carried out using populations with 18 or more individuals (*C. intestinalis*: 29 populations, *C. robusta*: 19 populations, Table S1) with ARLEQUIN v.3.5⁶⁵. Population pairwise differentiations (ϕ_{ST}) were carried out based on 10,000 random permutations. To investigate genetic differences among (ϕ_{CT}) and within (ϕ_{SC}) geographic areas, a hierarchical analysis of molecular variance (AMOVA) was done for each species with four groups for *C. robusta* (SE Pacific, NW Pacific, Mediterranean Sea and EC) and two groups for *C. intestinalis* (North Sea and EC). To avoid permuting across groups with a single sample, the population of *C. intestinalis* from Nahant (NW Atlantic) was excluded from the analysis. In addition, to avoid over-representation of the EC populations, the AMOVA was conducted with a random subsampling of 6 populations and was repeated with several other random subsampling populations without changing the results.

For a detailed comparison of the structure between Pacific and Atlantic coasts of North America²⁴ and other regions of our sampling, the same analyses were carried out using COX3-ND1 only. We aligned our COX3-ND1 sequences and cut them to same length as Zhan et al.²⁴ (580 bp for *C. robusta* and 530 bp for *C. intestinalis*). Two overlapping peaks observed at position 434 bp for *C. intestinalis* were observed on the forward sequence but not on the reverse sequence. As we did not have access to the chromatographs obtained by Zhan and coauthors, we chose to exclude this position from the sequence analyses to avoid adding false haplotypes. For AMOVA, five groups for *C. robusta* (SE Pacific, NW Pacific, NE Pacific, Mediterranean Sea, and the EC) and three groups for *C. intestinalis* (NW Atlantic, North Sea and the EC) were analyzed.

Bayesian analyses of Population Divergence. Considering the cryptogenic status of *C. intestinalis*⁴, we investigated the divergence history between populations of this species present both sides of the N Atlantic. An Isolation with Migration Model (IMM) was performed using IMA2⁶⁶. The IMM was applied to the COX3-ND1 dataset only, to include data from the NW Atlantic for *C. intestinalis*²⁴. Briefly, the IMA2 program explores parameter and genealogy space through Markov chain Monte Carlo algorithms (MCMC) from a gene genealogy compatible with the observed dataset and generates posterior probabilities of several parameters. A Hasegawa-Kishino-Yano mutation model⁶⁷ was used with a mutation rate of 1.89×10^{-5} per generation for the COX3-ND1 locus. This rate was estimated from the number of fixed mutations between *C. robusta* and *C. intestinalis* on COX3-ND1 sequences, divided by their divergence time estimated to be 3.8 My BP, with one generation per year¹⁵. To optimize computation time, a subset of 80 individuals on each side of the N Atlantic was used (population splitting pictured in Fig. 6a). MCMC repetitions were done with 10^6 steps after 100,000 long burn-in cycles. Finally, to test the influence of migration between areas after divergence, likelihood-ratio tests were performed on the nested model of gene flow according to Hey and Nielsen⁶⁸. Note that the low sampling coverage of the presumed Asian native range of *C. robusta* prevented us carrying out similar analyses for *C. robusta* in the Pacific.

Acknowledgments

We are very grateful to all our colleges who contributed to the collection of samples all over the world: the divers of the Marine Operations department (*Service Mer & Observation*) at the Roscoff Biological Station, P. Cirino, C. Lejeusne, S. Krueger-Hadfield, B. Lundve, M. Otani, J. Pechenik, C. Wood and A. Yunnies. We are thankful to G. Dubois and C. Roby for assistance with DNA extraction and statistical analyses and to N. Bierne for stimulating discussions on these datasets and advice for Bayesian analyses. We thank A. Zhan for kindly providing us with his raw data. This work was supported by the Bibliothèque du Vivant project (CNRS, INRA, MNHN), the Interreg IVa Marinexus program and the ANR project HYSEA (no.ANR-12-BSV7-0011).

Author contribution

SB, JDDDB and FV conceived the experiment design and contributed to sampling collection. SB ran the genetic labwork and prepared figures and tables. SB, JDDDB and FV analyzed the data and wrote the manuscript.

References

- 1 Elton, C. S. *The ecology of invasions by animals and plants* (eds Methuen & Co., Chapman & Hall) 181 pp. (University of Chicago Press, 1958).
- 2 Carlton, J. T. Pattern, process, and prediction in marine invasion ecology. *Biological Conservation* **78**, 97-106 (1996).
- 3 Appeltans, W., Ahyoung, S. T., Anderson, G., Angel, M. V. & Artois, T. The magnitude of global marine species diversity. *Current Biology* **22**, 2189-2202 (2012).
- 4 Haydar, D. What is natural? The scale of cryptogenesis in the North Atlantic Ocean. *Diversity and Distributions* **18**, 101-110 (2012).
- 5 Dijoux, L., Viard, F. & Payri, C. The more we search, the more we find: Discovery of a new lineage and a new species complex in the genus *Asparagopsis*. *PloS ONE* **9**(7), e103826 (2014).
- 6 Shenkar, N. & Swalla, B. J. Global diversity of Ascidiacea. *PloS ONE* **6**(6), e20657 (2011).
- 7 Procaccini, G., Affinito, O., Toscano, F. & Sordino, P. A new animal model for merging ecology and evolution in *Evolutionary Biology - Concepts, biodiversity, macroevolution and genome evolution* (ed Pontarotti, P.) Ch. 6, 91-106 (Springer, 2011).
- 8 Suzuki, M. M., Nishikawa, T. & Bird, A. Genomic approaches reveal unexpected genetic divergence within *Ciona intestinalis*. *Journal of Molecular Evolution* **61**, 627-635 (2005).
- 9 Caputi, L. *et al.* Cryptic speciation in a model invertebrate chordate. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104**, 9364-9369 (2007).
- 10 Zhan, A., Macisaac, H. J. & Cristescu, M. E. Invasion genetics of the *Ciona intestinalis* species complex: from regional endemism to global homogeneity. *Molecular Ecology* **19**, 4678-4694 (2010).
- 11 Brunetti, R. *et al.* Morphological evidence that the molecularly determined *Ciona intestinalis* type A and type B are different species: *Ciona robusta* and *Ciona intestinalis*. *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research* **53**, 186-193 (2015).
- 12 Pennati, R. *et al.* Morphological differences between larvae of the *Ciona intestinalis* species complex: hints for a valid taxonomic definition of distinct species. *PloS ONE* **10**(5), e0122879 (2015).
- 13 Sato, A., Satoh, N. & Bishop, J. D. D. Field identification of 'types' A and B of the ascidian *Ciona intestinalis* in a region of sympatry. *Marine Biology* **159**, 1611-1619 (2012).
- 14 Nydam, M. L. & Harrison, R. G. Genealogical relationships within and among shallow-water *Ciona* species (Ascidiacea). *Marine Biology* **151**, 1839-1847 (2007).
- 15 Roux, C., Tsagkogeorga, G., Bierre, N. & Galtier, N. Crossing the species barrier: genomic hotspots of introgression between two highly divergent *Ciona intestinalis* species. *Molecular Biology and Evolution* **30**, 1574-1587 (2013).
- 16 Bouchemousse, S., Lévêque, L., Dubois, G. & Viard, F. Co-occurrence and reproductive synchrony do not ensure hybridization between an alien tunicate and its interfertile native congener. *Evolutionary Ecology*, 1-19, doi:10.1007/s10682-015-9788-1 (in press 2015).
- 17 Nydam, M. L. & Harrison, R. G. Polymorphism and divergence within the ascidian genus *Ciona*. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **56**, 718-726 (2010).
- 18 Nydam, M. L. & Harrison, R. G. Introgression despite substantial divergence in a broadcast spawning marine invertebrate. *Evolution* **65**, 429-442 (2011).
- 19 Lambert, C. C. & Lambert, G. Non-indigenous ascidians in southern California harbors and marinas. *Marine Biology* **130**, 675-688 (1998).
- 20 Aldred, N. & Clare, A. S. Mini-review: Impact and dynamics of surface fouling by solitary and compound ascidians. *Biofouling* **30**, 259-270 (2014).
- 21 Carver, C. E., Mallet, A. L. & Vercaemer, B. Biological synopsis of the solitary tunicate *Ciona intestinalis*. *Canadian Manuscript Report of Fisheries and Aquatic Sciences* **2746** (2006).
- 22 Grosholz, E. Ecological and evolutionary consequences of coastal invasions. *Trends in Ecology & Evolution* **17**, 22-27 (2002).
- 23 Rius, M., Turon, X., Bernardi, G., Volckaert, F. A. M. & Viard, F. Marine invasion genetics: from spatio-temporal patterns to evolutionary outcomes. *Biological Invasions* **17**, 869-885 (2015).
- 24 Zhan, A. *et al.* Complex genetic patterns in closely related colonizing invasive species. *Ecology and Evolution* **2**, 1331-1346 (2012).
- 25 Rius, M. *et al.* Range expansions across ecoregions: interactions of climate change, physiology and genetic diversity. *Global Ecology and Biogeography* **23**, 76-88 (2014).

- 26 Affinito, O. *et al.* High connectivity and directional gene flow in European Atlantic and Mediterranean populations of *Ciona intestinalis* sp. A. *Marine Ecology*, 1-14, doi:10.1111/maec.12226 (in press 2014).
- 27 Castilla, J. C. *et al.* Down under the southeastern Pacific: marine non-indigenous species in Chile. *Biological Invasions* **7**, 213-232 (2005).
- 28 Galtier, N., Nabholz, B., Glemin, S. & Hurst, G. D. D. Mitochondrial DNA as a marker of molecular diversity: a reappraisal. *Molecular Ecology* **18**, 4541-4550 (2009).
- 29 Wares, J. P. & Cunningham, C. W. Phylogeography and historical ecology of the North Atlantic intertidal. *Evolution* **55**, 2455-2469 (2001).
- 30 Vermeij, G. J. From Europe to America: Pliocene to recent trans-Atlantic expansion of cold-water North Atlantic molluscs. *Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences* **272**, 2545-2550 (2005).
- 31 Goldstien, S. J. *et al.* Global Phylogeography of the Widely Introduced North West Pacific Ascidian *Styela clava*. *PLoS ONE* **6**(2), e16755 (2011).
- 32 Bock, D. G., MacIsaac, H. J. & Cristescu, M. E. Multilocus genetic analyses differentiate between widespread and spatially restricted cryptic species in a model ascidian. *Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences* **279**, 2377-2385 (2012).
- 33 Seebens, H., Gastner, M. T. & Blasius, B. The risk of marine bioinvasion caused by global shipping. *Ecology Letters* **16**, 782-790 (2013).
- 34 Haydar, D., Hoarau, G., Olsen, J. L., Stam, W. T. & Wolff, W. J. Introduced or glacial relict? Phylogeography of the cryptogenic tunicate *Molgula manhattensis* (Asciacea, Pleurogona). *Diversity and Distributions* **17**, 68-80 (2011).
- 35 Traustedt, M. P. A. *Ascidiae simplices fra det Stile Ocean in Meddr dansk naturh* (ed. Vidensk, M.) 1-160 (Foren Kjobenhavn, 1885).
- 36 Castilla, J. C. & Neill, P. E. Marine bioinvasions in the Southeastern pacific: Status, ecology, economic impacts, conservation and management in *Biological invasions in marine ecosystems* (eds Rilov, G., Crooks, J.A.) Ch. 26, 439-457 (Springer, 2009).
- 37 Geoffroy, A., Le Gall, L. & Destombe, C. Cryptic introduction of the red alga *Polysiphonia morrowii* Harvey (Rhodomelaceae, Rhodophyta) in the North Atlantic Ocean highlighted by a DNA barcoding approach. *Aquatic Botany* **100**, 67-71 (2012).
- 38 Bishop, J. D. D. *et al.* The Southern Hemisphere ascidian *Asterocarpa humilis* is unrecognised but widely established in NW France and Great Britain. *Biological Invasions* **15**, 253-260 (2013).
- 39 Dupont, L., Viard, F., David, P. & Bishop, J. D. D. Combined effects of bottlenecks and selfing in populations of *Corella eumyota*, a recently introduced sea squirt in the English Channel. *Diversity and Distributions* **13**, 808-817 (2007).
- 40 Collin, R., Farrell, P. & Cragg, S. Confirmation of the identification and establishment of the South American slipper limpet *Crepidatella dilatata* (Lamarck 1822) (Caenogastropoda: Calyptraeidae) in Northern Spain. *Aquatic Invasions* **4**, 377-380 (2009).
- 41 Perez-Portela, R., Turon, X. & Bishop, J. D. D. Bottlenecks and loss of genetic diversity: spatio-temporal patterns of genetic structure in an ascidian recently introduced in Europe. *Marine Ecology-Progress Series* **451**, 93-105 (2012).
- 42 Riquet, F., Daguin-Thiebaut, C., Ballenghien, M., Bierne, N. & Viard, F. Contrasting patterns of genome-wide polymorphism in the native and invasive range of the marine mollusc *Crepidula fornicata*. *Molecular Ecology* **22**, 1003-1018 (2013).
- 43 Rohlfritsch, A. *et al.* Population genomics shed light on the demographic and adaptive histories of European invasion in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Evolutionary Applications* **6**, 1064-1078 (2013).
- 44 Tepolt, C. K. & Palumbi, S. R. Transcriptome sequencing reveals both neutral and adaptive genome dynamics in a marine invader. *Molecular Ecology*, doi:10.1111/mec.13294 (in press 2015).
- 45 Jolly, M. T., Viard, F., Gentil, F., Thiebaut, E. & Jollivet, D. Comparative phylogeography of two coastal polychaete tubeworms in the Northeast Atlantic supports shared history and vicariant events. *Molecular Ecology* **15**, 1841-1855 (2006).
- 46 Rius, M., Pascual, M. & Turon, X. Phylogeography of the widespread marine invader *Microcosmus squamiger* (Asciacea) reveals high genetic diversity of introduced populations and non-independent colonizations. *Diversity and Distributions* **14**, 818-828 (2008).
- 47 Maggs, C. A. *et al.* Evaluating signatures of glacial refugia for North Atlantic benthic marine taxa. *Ecology* **89**, S108-S122 (2008).
- 48 Lambert, G. Ecology and natural history of the protochordates. *Canadian Journal of Zoology-Revue Canadienne De Zoologie* **83**, 34-50 (2005).

- 49 Wares, J. P., Goldwater, D. S., Kong, B. Y. & Cunningham, C. W. Refuting a controversial case of a human-mediated marine species introduction. *Ecology Letters* **5**, 577-584 (2002).
- 50 Chapman, J. W., Carlton, J. T., Bellinger, M. R. & Blakeslee, A. M. H. Premature refutation of a human-mediated marine species introduction: the case history of the marine snail *Littorina littorea* in the northwestern Atlantic. *Biological Invasions* **9**, 737-750 (2007).
- 51 Carver, C. E., Chisholm, A. & Mallet, A. L. Strategies to mitigate the impact of *Ciona intestinalis* (L.) biofouling on shellfish production. *Journal of Shellfish Research* **22**, 621-631 (2003).
- 52 Ramsay, A., Davidson, J., Bourque, D. & Stryhn, H. Recruitment patterns and population development of the invasive ascidian *Ciona intestinalis* in Prince Edward Island, Canada. *Aquatic Invasions* **4**, 169-176 (2009).
- 53 Ramsay, A., Davidson, J., Landry, T. & Arsenault, G. Process of invasiveness among exotic tunicates in Prince Edward Island, Canada. *Biological Invasions* **10**, 1311-1316 (2008).
- 54 Hartmeyer, R. Ascidiacea, Part II, Zugleich eine Übersicht die arktische und boreale Ascidiendfauna auf tiergeografischer Grundlage in *The Danish Ingolf Expedition*. *Copenhagen* **2**(7) 241-275 (1924).
- 55 Van Name, W. G. The North and South American ascidians. *Bulletin of the American Museum of Natural History* **84**, 1-476 (1945).
- 56 Berrill, N. J. *The Tunicata, with an account of the British species*. 354 pp. (Royal Society London, 1950).
- 57 Millar, R. H. Tunicata, Ascidiacea in *Marine Invertebrates of Scandinavia*. 123 pp. (Universitetsforlaget Oslo, 1966)
- 58 Hoshino, Z.-i. & Nishikawa, T. Taxonomic Studies of *Ciona intestinalis* (L.) and its allies. *Publications of the Seto Marine Biological laboratory* **30**, 61-79 (1985).
- 59 Sanamyan, K. *Ciona Fleming, 1822* in Shenkar, N. *et al.* *Ascidiacea World Database*. Accessed through: *World Register of Marine Species* (2014) Available at: <http://www.marinespecies.org/aphia.php?p=taxdetails&id=103488> (Accessed: 23th december 2014).
- 60 Dybern, B. I. The life cycle of *Ciona intestinalis* (L.) f. *typica* in relation to the environmental temperature. *Oikos* **16**, 109-131 (1965).
- 61 Iannelli, F., Pesole, G., Sordino, P. & Gissi, C. Mitogenomics reveals two cryptic species in *Ciona intestinalis*. *Trends in Genetics* **23**, 419-422 (2007).
- 62 Hall, T. A. BioEdit: a user friendly biological sequence alignment editor and analysis program for windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series* **41**, 95-98 (1999).
- 63 Rozas, J., Sanchez-DelBarrio, J. C., Messeguer, X. & Rozas, R. DnaSP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods. *Bioinformatics* **19**, 2496-2497 (2003).
- 64 Petit, R. J., El Mousadik, A. & Pons, O. Identifying populations for conservation on the basis of genetic markers. *Conservation Biology* **12**, 844-855 (1998).
- 65 Excoffier, L. & Lischer, H. E. L. Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resources* **10**, 564-567 (2010).
- 66 Hey, J. Isolation with migration models for more than two populations. *Molecular Biology and Evolution* **27**, 905-920 (2010).
- 67 Hasegawa, M., Kishino, H. & Yano, T. A. Dating of the human-ape splitting by a molecular clock of mitochondrial DNA. *Journal of Molecular Evolution* **22**, 160-174 (1985).
- 68 Hey, J. & Nielsen, R. Integration within the Felsenstein equation for improved Markov chain Monte Carlo methods in population genetics. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104**, 2785-2790 (2007).

Supplementary Information

Contrasting global genetic patterns in two biologically similar widespread and invasive *Ciona* species (Tunicata, Ascidiacea)

Sarah Bouchemousse^{1, 2*}, John D.D. Bishop³ and Frédérique Viard^{1, 2*}

Table S1. Sampling locations and details of genetic diversity indices of *Ciona robusta* and *C. intestinalis*.

Indices were computed over concatenated mitochondrial DNA sequences (COI and COX3-ND1). The English Channel is the only sympatric region wherein the two species were reported. S: syntopic localities, i.e. wherein the two species coexist in the same habitat; - : localities where *C. robusta* has never been reported so far (most recent surveys in autumn 2014, JDDb, pers. obs.).

Nind: the number of individuals studied; nf: not found. Indices: Nh: number of haplotypes; Npr: number of private haplotypes; Nh[x]: haplotypic richness, with rarefaction size within brackets; S: number of polymorphic sites; Hd: Haplotype diversity; π : nucleotide diversity.

Sampling location	Code	Status	<i>C. robusta</i>							<i>C. intestinalis</i>						
			Nind	Nh	Npr	Nh[18]	S	Hd	$\pi(10^2)$	Nind	Nh	Npr	Nh[19]	S	Hd	$\pi(10^2)$
North Eastern Atlantic	NEA															
English Channel	EC															
Brighton, UK	Bri	-	nf							23	15	4	12.89	36	0.925	0.453
Shoreham, UK	Sho	-	nf							24	18	5	14.97	45	0.967	0.753
Southsea, UK	Shs	-	nf							24	19	10	15.76	44	0.978	0.528
Gosport, UK	Gpt	-	nf							23	20	9	16.70	46	0.976	0.718
Southampton, UK	Sth	-	nf							21	17	6	15.66	36	0.976	0.549
Lymington, UK	Lym	-	nf							22	18	6	15.93	39	0.978	0.428
Poole Quay, UK	Poo	-	nf							24	20	7	16.21	46	0.975	0.661
Torquay, UK	Tor	S	1	1	0	-	-	-	-	24	11	4	9.67	32	0.870	0.715
Brixham, UK	Brx	-	nf							24	16	4	13.42	37	0.946	0.607
Plymouth, UK	Ply	S	24	5	2	4.20	5	0.377	0.056	24	18	9	14.83	35	0.964	0.708
Falmouth, UK	Fal	S	24	5	1	4.50	6	0.659	0.112	23	15	7	12.87	31	0.909	0.311
Saint Vaast, Fr	StV	S	24	2	0	1.95	1	0.159	0.011	25	18	6	14.53	38	0.963	0.692
Saint Malo, Fr	StM	S	23	1	0	1.00	0	0.000	0.000	19	13	3	13.00	36	0.924	0.657
Saint Quay, Fr	StQ	S	24	7	4	5.95	6	0.667	0.078	24	13	7	11.42	34	0.931	0.592
Perros Guirec, Fr	Per	S	24	3	1	2.50	2	0.163	0.012	26	21	6	16.37	47	0.985	0.776
Trébeurden, Fr	Tre	S	24	2	1	1.75	1	0.083	0.006	24	17	4	14.38	40	0.967	0.788
Roscoff-Bloscon, Fr	Blo	S	18	2	1	2.00	2	0.111	0.016	26	23	10	17.08	58	0.982	0.731
Aber Wrac'h, Fr	AbW	-	Nf							25	19	6	15.43	48	0.977	0.769
Brest-Château, Fr	Cha	S	23	2	0	1.96	1	0.166	0.012	27	21	8	15.77	43	0.977	0.784
Brest-Moulin Blanc, Fr	MBL	S	26	3	1	2.39	2	0.151	0.011	24	19	9	15.62	49	0.975	0.729
Camaret, Fr	Cam	S	24	1	0	1.00	0	0.000	0.000	21	20	7	18.19	51	0.995	0.922
Concarneau, Fr	Con	S	24	2	0	1.95	1	0.159	0.011	24	16	4	13.59	34	0.957	0.697
Lorient, Fr	Lor	-	nf							24	19	7	15.45	40	0.967	0.696
Crouesty, Fr	Cro	S	24	2	0	2.00	1	0.489	0.035	24	19	4	15.76	42	0.978	0.769
Quiberon, Fr	Qui	S	13	4	0	-	4	0.526	0.062	23	18	5	15.19	35	0.957	0.403
Total EC			320	18	13		18	0.285	0.033	592	229	157		211	0.979	0.692
North Sea (Skagerrak)	NS															
Grundsund, Sw	Grun									21	10	6	9.42	16	0.871	0.244
Gullmar Fjord, Sw	GullF									22	10	5	9.16	19	0.857	0.228

Fiskebäckskil, Sw	Fiske							24	10	4	8.85	13	0.851	0.184
Total NS								67	22	15		32	0.901	0.237
Total NEA		320	18	13		18	0.285	0.033	659	248	172	223	0.977	0.666
North Western Atlantic	NWA													
Nahant, US	Nah							24	12	7	10.77	32	0.917	0.632
Mediterranean Sea	MedS													
Naples, It	Napl	23	2	0	1.96	1	0.166	0.012						
Sete, Fr	Sete	21	11	8	10.10	8	0.910	0.143						
Total MedS		44	11	8		8	0.642	0.079						
South Eastern Pacific	SEP													
Antofagasta, Chile	Anto	3	3	1	-	7	1.000	0.333						
Coquimbo, Chile	Coqui	24	13	4	10.83	30	0.902	0.387						
Guanaqueros, Chile	Guana	24	12	2	10.14	27	0.913	0.354						
Talcahuano, Chile	Talca	9	6	2	-	16	0.833	0.345						
Puerto Montt, Chile	Mont	13	7	1	-	16	0.846	0.397						
Total SEP		73	21	11		40	0.898	0.377						
North Western Pacific	NWP													
Nishinomiya, Japan	Nishi	32	9	2	7.33	27	0.845	0.454						
Tokyo, Japan	Tokyo	32	8	1	6.50	19	0.774	0.340						
Total NWP		64	11	3		28	0.813	0.398						
<hr/>														
All dataset														
Mean		21	5	1		8	0.454	0.132	24	17	6	38	0.948	0.611
(SD)		(8)	(4)	(2)		(9)	(0.359)	(0.162)	(2)	(4)	(2)	(10)	(0.041)	(0.190)
Total		501	48	37		63	0.598	0.225	683	255	179	227	0.977	0.665

Table S2. Number of *Ciona intestinalis* individuals identified in clusters C1, C2 and C3 of the haplotype network.

Clusters were identified from the haplotype network built with concatenated mtDNA sequences (COI and COX3-ND1) and shown in Figure 4b in the main text.

Sampling location	Code	C1	C2	C3	Not in cluster	Total
North Eastern Atlantic						
<i>English Channel</i>						
Brighton, UK	Bri	19	3	1	0	23
Shoreham, UK	Sho	17	7	0	0	24
Southsea, UK	Shs	20	4	0	0	24
Gosport, UK	Gpt	15	6	1	1	23
Southampton, UK	Sth	17	4	0	0	21
Lymington, UK	Lym	20	2	0	0	22
Poole Quay, UK	Poo	18	6	0	0	24
Torquay, UK	Tor	16	5	3	0	24
Brixham, UK	Brx	20	2	2	0	24
Plymouth, UK	Ply	14	9	0	1	24
Falmouth, UK	Fal	22	1	0	0	23
Saint Vaast, Fr	StV	16	9	0	0	25
Saint Malo, Fr	StM	16	2	1	0	19
Saint Quay, Fr	StQ	18	1	5	0	24
Perros Guirec, Fr	Per	16	10	0	0	26
Trébeurden, Fr	Tre	13	8	3	0	24
Roscoff-Bloscon, Fr	Blo	18	4	2	2	26
Aber Wrac'h, Fr	AbW	18	5	2	0	25
Brest-Château, Fr	Cha	16	8	3	0	27
Brest-Moulin Blanc, Fr	MBI	19	4	1	0	24
Camaret, Fr	Cam	8	9	4	0	21
Concarneau, Fr	Con	16	6	1	1	24
Lorient, Fr	Lor	15	8	1	0	24
Crouesty, Fr	Cro	16	6	2	0	24
Quiberon, Fr	Qui	21	2	0	0	23
<i>North Sea</i>						
Grundsund, Sw	Grun	21	0	0	0	21
Gullmar Fjord, Sw	GullF	22	0	0	0	22
Fiskebäckskil, Sw	Fiske	24	0	0	0	24
North Western Atlantic						
Nahant, US	Nah	19	5	0	0	24
Total		491	136	32	5	683

Table S3. Population genetic diversity indices for *Ciona robusta* and *C. intestinalis*, computed from the mitochondrial COX3-ND1 sequences dataset.

Nind: number of individuals; Nh: number of haplotypes; Hd: haplotype diversity; π : nucleotide diversity. Sampling sites of Zhan et al.²⁴ are illustrated in Fig.S1.

Sampling location	Code	<i>C. robusta</i>				<i>C. intestinalis</i>				Source
		Nind	Nh	Hd	π (10 ²)	Nind	Nh	Hd	π (10 ²)	
North Eastern Atlantic	NEA									
English Channel	EC									
Brighton, UK	Bri					23	9	0.636	0.519	This study
Shoreham, UK	Sho					24	13	0.884	0.892	
Southsea, UK	Shs					24	16	0.917	0.719	
Gosport, UK	Gpt					23	14	0.881	0.932	
Southampton, UK	Sth					21	10	0.776	0.672	
Lymington, UK	Lym					22	13	0.840	0.466	
Poole Quay, UK	Poo					24	12	0.844	0.789	
Torquay, UK	Tor	1	1	-	-	24	7	0.779	0.839	
Brixham, UK	Brx					24	11	0.877	0.740	
Plymouth, UK	Ply	24	4	0.308	0.056	24	12	0.924	0.924	
Falmouth, UK	Fal	24	3	0.409	0.074	23	6	0.656	0.265	
Saint Vaast, Fr	StV	24	1	0.000	0.000	25	14	0.930	0.913	
Saint Malo, Fr	StM	23	1	0.000	0.000	19	9	0.801	0.745	
Saint Quay, Fr	StQ	24	3	0.424	0.079	24	8	0.808	0.689	
Perros Guirec, Fr	Per	24	3	0.163	0.029	26	11	0.871	0.959	
Trébeurden, Fr	Tre	24	1	0.000	0.000	24	10	0.870	0.974	
Roscoff-Bloscon, Fr	Blo	18	2	0.111	0.019	26	16	0.858	0.900	
Aber Wrac'h, Fr	AbW					25	13	0.920	0.946	
Brest-Château, Fr	Cha	23	2	0.166	0.029	27	10	0.815	0.930	
Brest-Moulin Blanc, Fr	MBI	26	2	0.077	0.013	24	13	0.932	0.885	
Camaret, Fr	Cam	24	1	0.000	0.000	21	15	0.952	0.956	
Concarneau, Fr	Con	24	1	0.000	0.000	24	9	0.866	0.913	
Lorient, Fr	Lor					24	10	0.793	0.877	
Crouesty, Fr	Cro	24	1	0.000	0.000	24	11	0.830	0.923	
Quiberon, Fr	Qui	13	2	0.154	0.027	23	9	0.723	0.460	
North Sea	NS									
Grundsund, Sw	Grun					21	5	0.633	0.214	
Gullmar Fjord, Sw	GullF					22	5	0.532	0.231	
Fiskebäckskil, Sw	Fiske					24	8	0.659	0.224	
North Western Atlantic	NWA									
Cardigan River, Ca	CR					30	8	0.556	0.188	[24]
Brudenell River, Ca	BR					30	3	0.191	0.037	
Murray River, Ca	MR					30	3	0.191	0.037	
Sydney, Ca	SD					42	5	0.577	0.195	
Point Tupper, Ca	PO					21	3	0.267	0.052	
Halifax, Ca	HF					28	4	0.429	0.308	
Chester, Ca	CT					28	4	0.418	0.124	
Martin's River, Ca	MA					45	5	0.574	0.146	
Mahone Bay, Ca	MB					28	3	0.569	0.121	
Stone Hurst, Ca	ST					26	6	0.652	0.171	
Lunenburg, Ca	LU					21	3	0.338	0.079	
Shelburne, Ca	SB					39	7	0.547	0.386	
Port La Tour, Ca	PT					21	3	0.267	0.052	
Yarmouth, Ca	YM					20	8	0.821	0.619	
Nahant, US	Nah					24	6	0.63	0.740	
Groton, US	GT					48	6	0.688	0.607	
Mediterranean Sea	MedS									
Naples, It	Napl	23	2	0.087	0.015					This study
Sete, Fr	Sete	21	3	0.186	0.033					
South Eastern Pacific	SEP									
Antofagasta, Chile	Anto	3	3	1.000	0.346					This study
Coquimbo, Chile	Coqui	24	8	0.764	0.288					
Guanaqueros, Chile	Guana	24	5	0.685	0.244					

Talcahuano, Chile	Talca	9	3	0.556	0.250	This study
Puerto Montt, Chile	Mont	13	5	0.808	0.231	
North Western Pacific	NWP					
Nishinomiya, Japan	Nishi	32	7	0.821	0.341	
Tokyo, Japan	Tokyo	32	6	0.758	0.261	
North Eastern Pacific	NEP					[24]
Tomales Bay, US	TB	13	4	0.679	0.471	
San Francisco Estuary, US	SF	9	5	0.861	0.597	
Monterey Bay, US	MO	8	2	0.429	0.297	
Santa Barbara, US	SB	16	6	0.783	0.298	
Channel Islands, US	CI	27	8	0.772	0.434	
Port Hueneme, US	PH	21	8	0.752	0.465	
Los Angeles, US	LA	31	5	0.735	0.321	
Newport Bay, US	NB	21	5	0.776	0.333	
Oceanside Estuary, US	OE	23	8	0.838	0.429	
Mission Bay, US	MI	8	3	0.714	0.322	
San Diego, US	SD	26	7	0.769	0.397	

Table S4. Estimates of pairwise population genetic differentiation for *Ciona robusta* (a) and *C. intestinalis* (b).

The fixation index ϕ_{ST} was computed based on concatenated mitochondrial DNA sequences (COI and COX3-ND1) with the software Arlequin v 3.5. Bold numbers indicate statistical significance (P -value < 0.05). Population labels are detailed in Table 1 in the main text.

(a)

	Blo	Cha	MBI	Cam	Con	Cro	Fal	Per	Ply	StQ	StM	Tre	StV	Guana	Coqui	Nishi	Tokyo	Napl
Blo																		
Cha	0.022																	
MBI	0.003	-0.017																
Cam	0.016	0.048	-0.003															
Con	-0.029	0.045	0.023	0.043														
Cro	0.188	0.288	0.294	0.348	0.181													
Fal	0.224	0.253	0.264	0.274	0.258	0.293												
Per	0.002	0.023	0.000	0.000	0.022	0.285	0.255											
Ply	0.038	0.056	0.055	0.061	0.058	0.197	0.078	0.051										
StQ	0.040	0.069	0.071	0.079	0.058	0.147	0.187	0.066	0.064									
StM	0.014	0.045	-0.005	0.000	0.041	0.342	0.269	-0.002	0.058	0.076								
Tre	0.007	0.032	0.000	0.000	0.029	0.313	0.264	0.000	0.055	0.072	-0.002							
StV	-0.029	0.045	0.000	0.043	-0.043	0.181	0.258	0.022	0.058	0.058	0.041	0.029						
Guana	0.460	0.494	0.511	0.507	0.498	0.487	0.405	0.499	0.452	0.437	0.501	0.503	0.498					
Coqui	0.364	0.399	0.416	0.412	0.401	0.391	0.325	0.404	0.361	0.349	0.406	0.408	0.401	-0.014				
Nishi	0.508	0.535	0.549	0.544	0.540	0.538	0.451	0.540	0.499	0.522	0.539	0.542	0.540	0.056	0.088			
Tokyo	0.575	0.601	0.615	0.611	0.606	0.602	0.509	0.5601	0.562	0.584	0.606	0.608	0.606	0.071	0.122	0.006		
Napl	0.000	0.036	0.021	0.033	-0.034	0.156	0.244	0.019	0.052	0.051	0.030	0.024	-0.034	0.488	0.392	0.535	0.601	
Sete	0.103	0.151	0.163	0.171	0.120	0.056	0.214	0.157	0.137	0.104	0.166	0.164	0.120	0.425	0.338	0.497	0.555	0.111

(b)

	AbW	Blo	Cha	Bri	MBI	Brx	Cam	Con	Cro	Fal	Gpt	Lor	Lym	Per	Ply	Poo	Qui	Sho	Shs	StQ	Sth	StM	Tre	Tor	StV	Fiske	Grun	GullF
AbW																												
Blo	-0.012																											
Cha	-0.025	-0.015																										
Bri	0.052	0.002	0.048																									
MBI	0.028	-0.010	-0.021	0.050																								
Brx	0.045	0.006	0.029	0.013	0.045																							
Cam	0.016	0.069	0.014	0.175	0.027	0.139																						
Con	-0.009	0.036	0.000	0.130	-0.014	0.117	-0.005																					
Cro	-0.021	0.012	-0.025	0.092	-0.019	0.073	-0.012	-0.028																				
Fal	0.162	0.099	0.190	0.089	0.182	0.106	0.312	0.276	0.228																			
Gpt	-0.022	-0.020	-0.020	0.021	-0.026	0.024	0.050	0.009	-0.008	0.145																		
Lor	0.005	0.064	0.012	0.172	0.006	0.145	-0.015	-0.029	-0.020	0.316	0.034																	
Lym	0.094	0.035	0.097	0.002	0.091	0.037	0.229	0.182	0.142	0.078	0.049	0.225																
Nah	-0.008	-0.009	0.000	0.035	-0.008	0.034	0.080	0.027	0.011	0.132	-0.012	0.050	0.068															
Per	-0.009	0.035	0.004	0.115	-0.011	0.103	0.002	-0.027	-0.022	0.250	0.009	-0.020	0.162	-0.022														
Ply	-0.009	0.029	0.006	0.112	-0.013	0.092	0.013	-0.027	-0.016	0.255	0.005	-0.015	0.162	-0.022														
Poo	-0.011	-0.018	-0.011	0.012	-0.017	0.027	0.075	0.024	0.009	0.135	-0.021	0.049	0.042	0.017	0.014													
Qui	0.067	0.014	0.072	-0.006	0.066	0.015	0.205	0.154	0.113	0.078	0.035	0.194	-0.001	0.133	0.133	0.022												
Sho	-0.021	-0.010	-0.015	0.044	-0.022	0.045	0.040	-0.002	-0.014	0.165	-0.024	0.018	0.083	-0.004	-0.005	-0.013	0.053											
Shs	0.036	-0.006	0.031	-0.016	0.030	0.012	0.153	0.099	0.069	0.082	0.005	0.140	-0.003	0.088	0.085	-0.003	0.000	0.018										
StQ	0.077	0.037	0.058	0.058	0.083	-0.005	0.156	0.154	0.108	0.155	0.063	0.183	0.086	0.148	0.132	0.074	0.076	0.090	0.062									
Sth	0.027	-0.009	0.030	-0.006	0.020	0.020	0.144	0.092	0.063	0.099	-0.007	0.129	-0.005	0.079	0.077	-0.012	-0.006	0.019	-0.019	0.068								
StM	-0.027	-0.030	-0.028	0.014	-0.027	0.009	0.051	0.012	-0.010	0.147	-0.031	0.035	0.056	0.009	0.004	-0.030	0.027	-0.028	-0.002	0.048	-0.007							
Tre	-0.019	0.007	-0.024	0.086	-0.018	0.055	-0.004	-0.011	-0.026	0.218	-0.007	-0.003	0.135	-0.011	-0.003	0.011	0.103	-0.003	0.067	0.081	0.055	-0.012						
Tor	0.024	0.016	0.012	0.060	0.028	0.003	0.077	0.061	0.032	0.172	0.018	0.082	0.097	0.061	0.039	0.029	0.078	0.024	0.047	0.005	0.050	0.002	0.024					
StV	-0.020	0.002	-0.007	0.053	-0.023	0.055	0.031	-0.008	-0.018	0.192	-0.018	0.011	0.101	-0.015	-0.013	-0.010	0.072	-0.021	0.033	0.107	0.030	-0.017	-0.008	0.038				
Fiske	0.220	0.139	0.251	0.111	0.226	0.135	0.371	0.336	0.284	0.060	0.187	0.381	0.085	0.305	0.313	0.174	0.095	0.213	0.103	0.181	0.125	0.199	0.270	0.217	0.241			
Grun	0.241	0.178	0.273	0.178	0.255	0.181	0.372	0.349	0.301	0.098	0.217	0.387	0.148	0.315	0.328	0.213	0.168	0.240	0.167	0.223	0.174	0.232	0.287	0.244	0.266	0.091		
GullF	0.200	0.114	0.218	0.072	0.198	0.103	0.344	0.309	0.257	0.117	0.153	0.353	0.026	0.277	0.285	0.140	0.054	0.184	0.066	0.150	0.072	0.163	0.240	0.186	0.212	0.075	0.188	
Nah	-0.008	-0.009	0.000	0.035	-0.008	0.034	0.080	0.027	0.011	0.132	-0.012	0.050	0.068	0.020	0.019	-0.013	0.026	-0.015	0.009	0.091	0.012	-0.020	0.014	0.037	-0.004	0.182	0.204	0.169

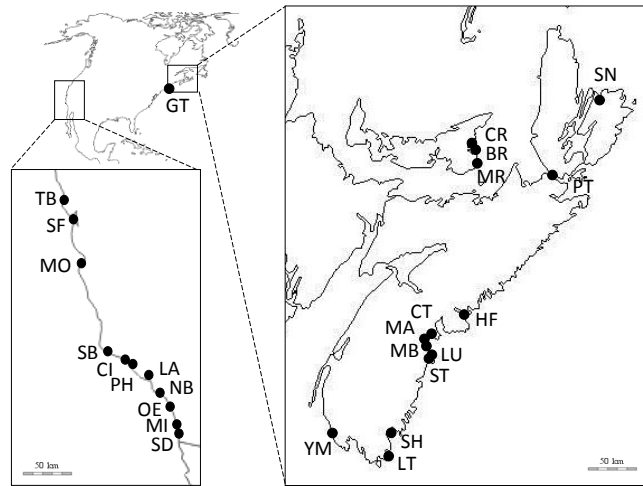


Figure S1. Sampling sites of *Ciona robusta* and *C. intestinalis* in North America from Zhan et al.²⁴ (for population codes, see Table S4)

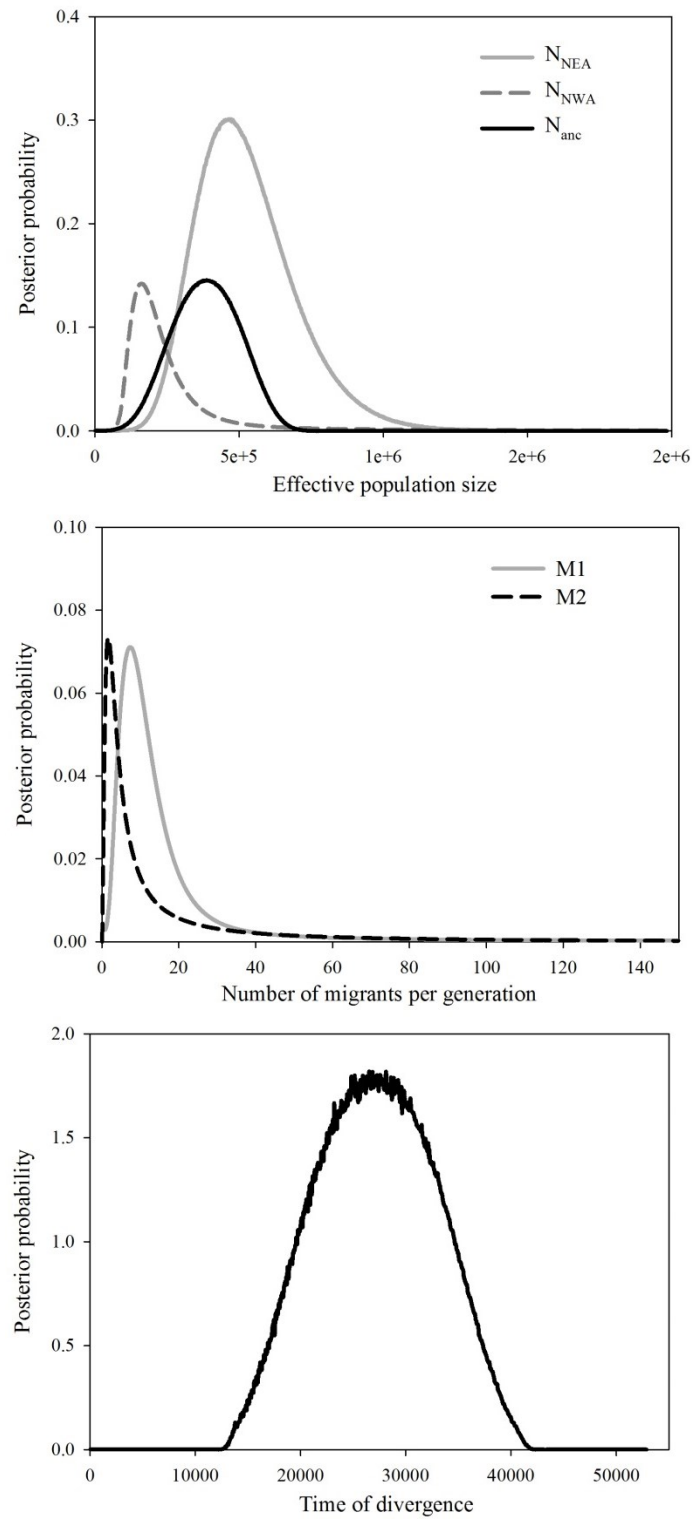


Figure S2. Marginal posterior distribution of parameters in the IMM computed with IMa2 for examining the history of isolation between populations of *C. intestinalis*.

Distribution curves are shown for 1) the effective size of the study populations, namely NE Atlantic and NW Atlantic (N_{NEA} and N_{NWA} , respectively) and their ancestral population (N_{anc}), 2) the number of effective migrants per generation (with M_1 and M_2 being the number of migrants from N_{NEA} to N_{NWA} and from N_{NWA} to N_{NEA} , respectively) and 3) the time of divergence between the two sides of the Atlantic. The median value and the 95% highest posterior density of each parameter are given in Figure 6 in the main text.

- Conclusion & Perspectives -

I. Synthèse des résultats

Au cours de cette thèse, je me suis intéressée aux conséquences éco-évolutives d'un contact secondaire d'origine anthropique. Ce dernier a eu lieu en Manche Occidentale et Bretagne Sud entre deux espèces d'ascidies congénériques et interfertiles, *Ciona robusta* (non-indigène) et *Ciona intestinalis* (indigène). Je me suis plus spécifiquement intéressée à cinq questions, reprises ci-dessous et accompagnées d'un bref résumé des principaux résultats obtenus.

- **Dans quel type de communauté sont établies les deux espèces au sein des habitats portuaires ?**

Les approches expérimentales et observations *in situ* réalisées ont montré que les deux espèces coexistent dans la majorité des ports étudiés au sein de communautés homogènes d'espèces. Il existe toutefois des exceptions à ce schéma général : 1) Perros Guirec a montré un patron atypique en termes de diversité spécifique et d'abondance d'espèces et 2) Roscoff et l'Aber Wrac'h sont deux ports où *C. robusta* est absente. Lorsqu'elles sont en syntopie, *C. intestinalis* et *C. robusta* montrent de fortes différences de densité de leurs populations, avec une abondance beaucoup plus importante de l'espèce indigène, *C. intestinalis*, par rapport à sa congénère introduite.

- **La dynamique des populations est-elle similaire pour les deux espèces ?**

L'étude de la dynamique de sédentarisation des juvéniles de *C. robusta* et *C. intestinalis* (identifiés à l'aide d'outils moléculaires) a mis en évidence un cycle similaire chez les deux espèces, avec deux générations annuelles : l'une caractérisée par une période de sédentarisation printanière/estivale et l'autre par une période de sédentarisation automnale. Cette étude indique ainsi l'absence de décalages phénologiques entre les deux espèces. Par ailleurs, elle documente une faible abondance des juvéniles de *C. robusta* par rapport à sa congénère indigène *C. intestinalis*. Enfin, nous avons mis en évidence dans deux des trois localités où *C. robusta* était présente une augmentation de l'abondance relative des juvéniles de cette espèce au cours de l'année suggérant un léger accroissement de sa capacité à occuper l'espace en période automnale, par rapport à sa congénère indigène, qui reste néanmoins toujours dominante.

- **Quel est le potentiel d'hybridation entre les deux espèces dans la zone de sympatrie ?**

Afin de mieux appréhender le potentiel d'hybridation, nous avons analysé les patrons de coexistence de *C. robusta* et *C. intestinalis*, sur une durée de 3 ans (soit 6 générations consécutives) dans 7 ports. Nos données associées à celles de la littérature vont dans le sens

d'une présence durable de *C. robusta* à l'échelle régionale. Elles documentent par ailleurs une augmentation de l'abondance relative de *C. robusta* entre les générations printanières et automnales, comme ce que nous avons mis en évidence chez les juvéniles. La coexistence stable en syntopie des deux espèces, leur inter-fertilité en laboratoire ainsi que la présence simultanée d'individus reproducteurs *in situ* indiquent un fort potentiel d'hybridation en milieu naturel. L'hybridation réalisée s'est avérée en revanche très faible : l'analyse de marqueurs moléculaires considérés comme diagnostiques des deux espèces n'a en effet révélé qu'un seul probable hybride de première génération et, plus globalement, de très faibles flux de gènes interspécifiques (concernant moins de 4 % des individus) dans les populations naturelles.

- **Quelle est l'importance relative des flux de gènes interspécifiques contemporains et historiques ?**

Compte-tenu des résultats précédents, nous avons choisi de développer une approche à l'échelle du génome pour tester l'hypothèse que les flux de gènes interspécifiques observés dans les populations bretonnes résultent d'introgressions anciennes et non de flux de gènes contemporains. L'utilisation de plus de 300 SNPs distribués le long du génome a confirmé la quasi absence de flux de gènes interspécifiques dans les localités syntopiques. Par ailleurs, ces flux de gènes ont la même intensité dans les populations en allopatrie (témoins d'absence de flux de gènes contemporains). Ces résultats confirment donc l'une des hypothèses avancées dans l'étude précédente, à savoir que l'introgression observée résulte d'introgressions anciennes. Elle s'est certainement répandue à une échelle mondiale par la combinaison de changements naturels d'aires de distribution et de processus d'introductions biologiques. Nos résultats suggèrent également l'existence de barrières aux flux de gènes en milieu naturel entre les deux espèces même en situation de syntopie. De façon peut être plus anecdotique (quoiqu'importante pour des diagnostics *in situ*), cette étude remet en cause le caractère diagnostique de certains marqueurs utilisés couramment pour distinguer les deux espèces.

- **Quelle est l'histoire démographique et migratoire des deux espèces à l'échelle mondiale ?**

L'étude précédente a mis en évidence des profils génétiques particuliers au Chili en comparaison des populations de *C. robusta* analysées dans la zone de sympatrie en Manche. Ceci justifie d'entreprendre une étude plus globale, de type phylogéographique, qui a été menée ici avec deux marqueurs mitochondriaux. *C. intestinalis* présente une diversité génétique plus importante que *C. robusta* à l'échelle mondiale, un résultat confirmant de précédentes études basées sur des marqueurs nucléaires mais de plus petits échantillonnages ou couverture géographique. Par ailleurs, nos résultats nous ont amené à proposer de nouvelles hypothèses quant à la distribution naturelle des deux espèces. Par exemple, les résultats de l'analyse Bayésienne suggèrent un statut indigène de *C. intestinalis* en Atlantique Nord-Ouest. Cette hypothèse n'est toutefois pas soutenue par la faible structure génétique observée entre les deux côtes, qui pourrait être le résultat de processus récents d'introduction biologique interférant avec des processus migratoires plus anciens. Cette étude a aussi permis de valider une relation attendue entre la date d'introduction et la diversité génétique des populations introduites de *C. robusta*. En génétique des invasions d'espèces marines, c'est un résultat assez rare qui s'explique ici sûrement par la très récente introduction de *C. robusta* en Europe. Ainsi, en Europe, les données soutiennent l'hypothèse d'une introduction récente qui porte encore la trace d'évènements de fondation ou de goulot d'étranglement, alors que dans le Pacifique Est les résultats sont en faveur de l'hypothèse d'introductions multiples, un scénario communément observé chez les espèces marines.

Ces résultats ouvrent chacun ou de façon combinée des perspectives de recherche présentées dans les prochains paragraphes par thèmes d'étude.

II. Thème 1 : Etude des interactions compétitives et du devenir des deux espèces dans leur zone de sympatrie

Les études de la densité des populations (chap. 1) et de la dynamique de sédentarisation (chap. 2) ont montré une dominance de l'espèce indigène *C. intestinalis* sur l'espèce introduite *C. robusta* dans les habitats portuaires bretons. Plusieurs explications non exclusives les unes des autres peuvent être proposées face à ce résultat.

La dominance de *C. intestinalis* pourrait notamment suggérer **une résistance biotique à l'installation de l'espèce non-indigène**, par exemple par une colonisation précoce suivie d'une monopolisation de l'espace dans les premiers stades du cycle de vie (ex. sédentarisation des juvéniles), en particulier au cours de la période printanière. La plus forte compétitivité de *C. intestinalis* pourrait expliquer l'absence de *C. robusta* dans le port de l'Aber Wrac'h (chap. 1 et 3). En effet, ce port présente le cortège d'espèces non-indigènes trouvées en Bretagne (chap. 1), donc il est peu vraisemblable que la non-introduction de *C. robusta* dans cette localité y explique son absence. **Afin d'analyser si et comment cette occupation de l'espace à un stade précoce a lieu, il serait intéressant de mettre en œuvre des approches expérimentales** en laboratoire pour étudier, par exemple, 1) la proportion de larves des deux espèces se sédentarisant lorsqu'elles sont mises en équiproportion dans un milieu donné, 2) l'effet de la présence de juvéniles ou d'adultes hétérospécifiques sur la sédentarisation des larves de l'une ou l'autre des deux espèces (i.e. effet d'attraction et donc de renforcement de la population en place), 3) les performances en terme de croissance entre les juvéniles des deux espèces et leur capacité à monopoliser un espace vierge, en fonction de certains paramètres environnementaux clés, tels que la température et la salinité (voir ci-dessous).

Les conditions environnementales pourraient également expliquer les résultats obtenus car les préférences thermiques diffèrent entre les deux espèces, avec une affinité pour des températures plus élevées pour *C. robusta* (Procaccini *et al.* 2011). En accord avec cette caractéristique, nous avons observé une augmentation de l'abondance relative des individus de *C. robusta* aux stades juvéniles et adultes en été et automne (chap. 2 & 3). Les faibles valeurs d'abondance à la fois aux stades juvéniles et adultes de *C. robusta* observés après la période hivernale suggèrent que *C. intestinalis* présente un meilleur taux de survie que *C. robusta* face aux températures plus froides. Les variations observées au stade adulte sont résumées dans la figure C.1 présentant les abondances relatives des deux espèces au stade adulte (données du chapitre 3) et les températures moyennes par saison.

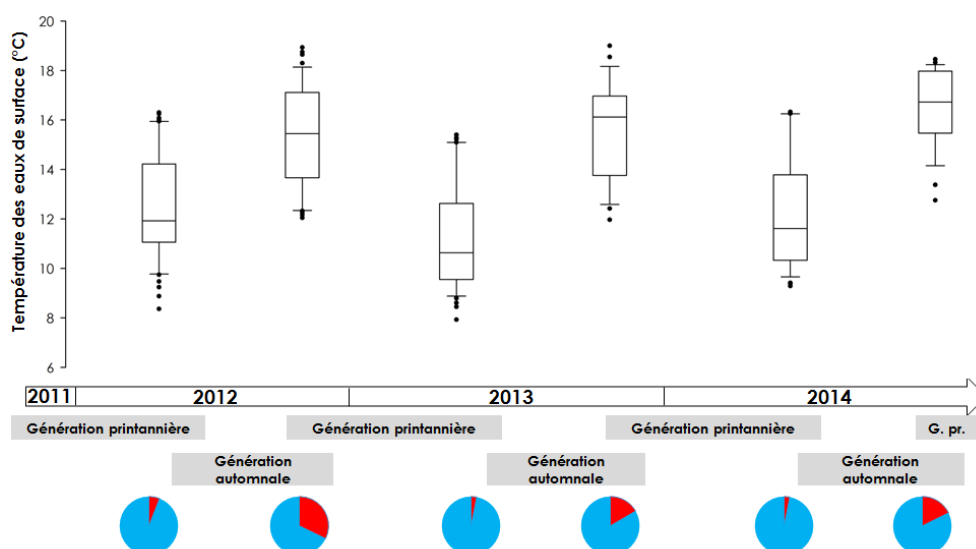


Figure C.1. **Variation saisonnière de l'abondance relative de *C. robusta* (en rouge) et de *C. intestinalis* (en bleu)** au cours de 6 générations consécutives, et sur un ensemble de ports étudiés dans le chapitre 3 (voir Bouchemousse *et al.* 2015) et **variations saisonnières de la température des eaux de surface** (présentées sous la forme de boîtes à moustache) calculées pour chacune des périodes correspondant aux générations étudiées. Les données de température ont été collectées à l'aide d'enregistreurs automatiques (TidbiT®v2) placés dans 7 des 11 ports étudiés au cours des 3 années de suivi.

Cet avantage possible de *C. intestinalis* dans des conditions plus froides pourrait expliquer la disparition de *C. robusta* à Roscoff, localité où les conditions environnementales, notamment les faibles températures estivales (Figure C.2) pourraient être particulièrement défavorables à cette espèce. L'affinité de *C. robusta* pour des températures plus élevées pourrait au contraire expliquer son abondance plus élevée par rapport à *C. intestinalis* dans le port de Perros-Guirec. Ce port montre en effet des températures plus élevées que celles observées en moyenne sur l'ensemble des ports bretons (Figure C.2).

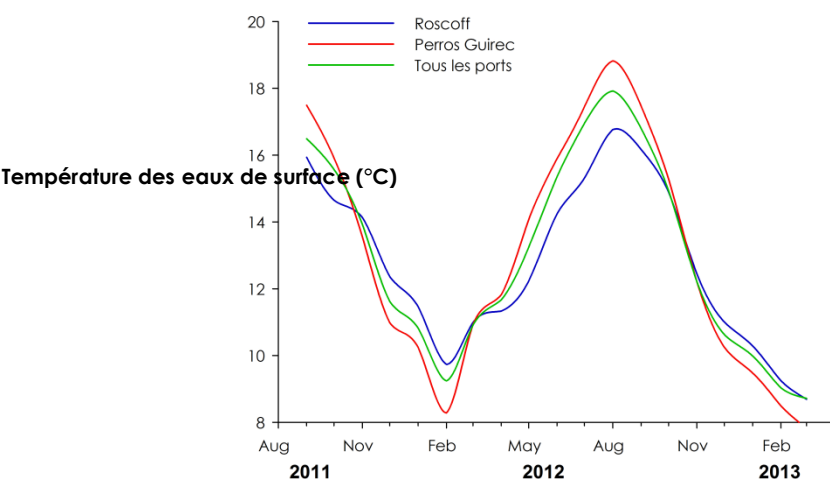


Figure C.2. **Variation de la moyenne mensuelle (courbe verte) de la température des eaux de surface** enregistrée dans 7 ports bretons étudiés dans le chap.1 (étude des communautés de faune sessile). Les courbes en rouge et bleu correspondent respectivement aux seuls ports de Perros-Guirec et Roscoff. Les données de température ont été obtenues à l'aide d'enregistreurs automatiques (TidbiT®v2) installés *in situ* de septembre 2011 à mars 2013.

Même si l'installation de *C. robusta* semble localement précaire en regard de son abondance et des apparitions-disparitions observées, l'augmentation de la température des eaux de surface s'opérant actuellement dans l'Atlantique Nord-Est et la Manche en particulier (Gallon *et al.* 2014) pourraient contribuer à favoriser son installation durable, voire la (re-)colonisation de nouveaux sites à plus long terme, et peut être, lui permettre d'étendre sa distribution plus au nord.

Par ailleurs, les populations étudiées étant localisées à de faibles profondeurs (i.e. la profondeur immergée des pontons flottants est au maximum de 30 cm), les variations de salinité des eaux de surface, dues à de fortes pluies ou à l'apport d'eau douce des bassins versants situés à côté des habitats étudiés (ex. Moulin Blanc et l'Aber Wrac'h), pourraient jouer un rôle fondamental sur l'abondance des deux espèces et notamment de l'espèce non-indigène. Les deux facteurs température et salinité pourraient également agir en interaction. Dans le chapitre 3, nous avons avancé l'hypothèse que de fortes pluies pourraient être à l'origine d'évènements de mortalité massive qui peuvent favoriser l'une ou l'autre des deux espèces selon la saison à laquelle les évènements de dessalure ont lieu.

La température et la salinité sont considérées comme les plus importants paramètres influençant la dynamique des populations et la distribution des espèces d'ascidies à l'échelle mondiale (Lambert 2005). Ils sont certainement les paramètres les plus étudiés dans la littérature pourtant, en particulier **dans les habitats portuaires, d'autres facteurs pourraient jouer un rôle clé tels que la résistance aux polluants ou la turbidité**. Ainsi dans l'objectif d'évaluer le devenir à long terme de la coexistence entre les deux espèces, il serait intéressant de poursuivre les relevés d'abondance de *C. robusta* et *C. intestinalis* réalisés au cours de cette thèse mais en associant aux relevés de température, **un suivi continu des variations de salinité, de la turbidité, de certains polluants et métaux lourds**, tels que le cadmium, le mercure ou le zinc qui ont des effets sur la reproduction et le développement larvaire des ciones (Gallo et al. 2011). Par ailleurs, les approches corrélatives entre des mesures de paramètres physico-chimiques effectuées *in situ* et des données de dynamique des populations sont souvent insatisfaisantes. En effet, il est impossible de mesurer l'ensemble des paramètres environnementaux susceptibles d'avoir une influence et donc de comprendre les effets que chacun de ces paramètres ainsi que de leurs interactions pourraient avoir sur l'abondance des deux espèces de ciones. Il serait donc important **d'associer à ces suivis des approches expérimentales en laboratoire**. Par exemple, tester l'effet croisé de la température et de la salinité sur les capacités d'occupation de l'espace par *C. intestinalis* et *C. robusta* pourrait nous donner une idée des réponses des deux espèces face aux variations environnementales observées dans la zone d'étude.

Enfin, il est important de noter que les études réalisées au cours de cette thèse se sont focalisées exclusivement sur les populations présentes sous les pontons. Or, les habitats portuaires présentent une multitude de structures (ex. piliers, enrochements ou digues, brises-clapots, etc. ; Mineur et al. 2012), qui ne présentent pas les mêmes caractéristiques physico-chimiques ou d'exposition aux facteurs environnementaux (ex. lumière ; temps d'émersion). Il est possible que la faible abondance des populations de *C. robusta* que nous avons mesurée dans les ports bretons soit expliquée par l'habitat « ponton » étudié au cours de cette thèse. Les espèces non-indigènes sont connues pour posséder une certaine plasticité leur permettant de coloniser différents types d'habitats. C'est par exemple le cas de l'algue invasive *Undaria pinnatifida* pouvant se développer sur des roches, du métal, du plastique, de l'aluminium etc., une propriété qui a pu favoriser son installation durable (Silva et al. 2002). Les résultats des RAS réalisés au port de Roscoff montrant une abondance de l'ascidie introduite *Didemum vexillum* très élevée dans les enrochements par rapport aux pontons est un autre exemple de l'hétérogénéité spatiale dans l'occupation des structures portuaires (chap. 1). Cependant, concernant *C. robusta*, les observations réalisées dans le cadre d'un suivi mensuel d'une durée de 3 ans des populations de ciones établies sur des piliers dans le port du Moulin Blanc (L. Lévêque, données non publiées) ne vont pas dans le sens de cette hypothèse d'un effet des pontons limitant l'installation de *C. robusta*. Au contraire, les pontons semblent offrir un habitat plus favorable que les piliers. En effet, au cours de ce suivi comparant piliers et pontons au port du Moulin-Blanc, un seul individu *C. robusta* a été identifié sur un total de 1077 individus des deux espèces sur les piliers alors que cette espèce était représentée par 233 individus sur un total de 1741 sur les pontons. Il serait toutefois intéressant d'élargir les suivis et observations en plongée dans d'autres ports, le port du Moulin

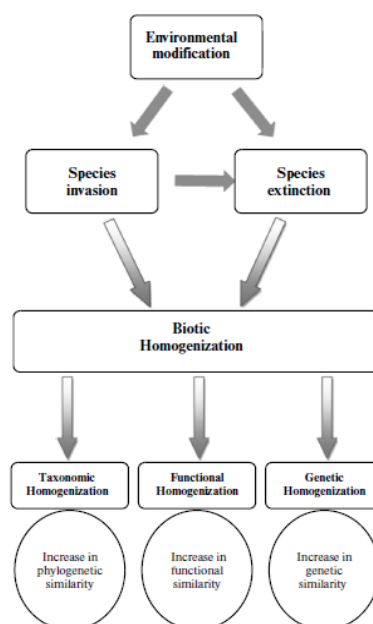
Blanc montrant une dynamique un peu atypique concernant les deux espèces de ciones (chap. 2 & 3). Cette information permettrait de **mieux apprécier la distribution et l'abondance de *C. robusta*, à une échelle locale et régionale, et permettrait de caractériser d'éventuels « réservoirs » qui pourraient alimenter des populations plus instables.**

III. Thème 2 : Analyse couplée de la diversité intra- et interspécifique dans les habitats portuaires

Comme rappelé précédemment, à l'exception du port de Perros Guirec, des peuplements homogènes d'ascidies ont été observés dans les ports étudiés. Beaucoup des espèces rencontrées sont également décrites dans d'autres localités portuaires à travers le monde, telles que l'ascidie coloniale *D. vexillum* ou l'ascidie solitaire *S. clava* (Lambert 2009; Locke 2009; Goldstien *et al.* 2011). Cette homogénéisation biotique régionale et mondiale est une des conséquences bien documentée des processus d'introduction biologique (Dar & Reschi 2014). Elle peut entraîner des effets en cascade à la fois sur la diversité génétique, taxonomique et fonctionnelle (Figure C.3).

Au cours de cette thèse je me suis intéressée essentiellement à l'homogénéité taxonomique à une échelle régionale (chap. 1). J'ai par ailleurs abordé de façon plus indirecte la question de l'homogénéisation génétique à travers l'étude de la diversité génétique de *C. robusta* à une échelle régionale et mondiale (chap. 4 & 5). Ces études ont montré des disparités génétiques fortes entre les populations introduites dans les différentes régions d'introduction (ex. Pacifique Nord-Ouest vs. Europe) avec toutefois des similarités génétiques à l'échelle régionale (ex. entre les populations de la Manche). Il serait intéressant de poursuivre ces analyses avec une étude dédiée, basée sur des marqueurs nucléaires, et étendue à d'autres espèces non-indigènes. Un cadre conceptuel pour l'étude des homogénéisations biotiques au niveau taxonomique et génétique est celui de la corrélation entre les patrons de la diversité génétique et spécifique appelé «species genetic diversity correlation» ou SGDC (Vellend 2003; Encadré 10). Cette approche part du constat que différents processus agissent à la fois sur les patrons de la diversité génétique et spécifique : par exemple, dans le cas des introductions biologiques, les processus de migrations assistées par l'homme sont à l'origine du mouvement aussi bien des espèces que des allèles d'une espèce entre différentes régions géographiques.

Figure C.3. **Conséquences écologiques et évolutives de l'homogénéisation biotique à l'échelle mondiale.** Figure tirée de Dar & Reshi (2014).



Encadré 10. **Corrélation entre diversité génétique et diversité spécifique**
 (« species genetic diversity correlation », Vellend 2003)

Expliquer l'origine des patrons de la biodiversité est une question fondamentale en écologie et biologie évolutive, et particulièrement en biologie de la conservation. La biodiversité dans son ensemble est classée selon trois niveaux hiérarchiques (Figure E10). Alors que l'étude de la diversité écosystémique est une notion relativement récente, l'étude de la diversité intra et interspécifique est relativement ancienne mais a traditionnellement fait l'objet de deux disciplines bien distinctes (Urban *et al.* 2008).



Figure E10. **Représentation des principaux niveaux d'organisation hiérarchique de la biodiversité.** Figure tirée de Robuchon (2014)

Pourtant de nombreux parallèles existent entre la théorie de la génétique des populations et celle de l'écologie des communautés (Johnson & Stinchcombe 2007; Vellend 2003), et qui ont été à l'origine de la « théorie neutre » explicitée par Hubbell dans son ouvrage de 2001 (Hubbell 2001; Rosindell *et al.* 2011). Des processus communs agissent au niveau population et communautés : par exemple, les processus de migration sont à l'origine du mouvement aussi bien des espèces que des allèles entre différentes régions géographiques. Ces événements « neutres » entraînent l'établissement de patrons de diversité génétique et spécifique qui devraient être positivement corrélés entre eux (« species genetic diversity correlation » ou SGDC; Vellend 2003). Ces corrélations positives ont été mises en évidence dans plusieurs études en milieux terrestres et aquatiques (ex. Vellend 2005; Evanno *et al.* 2009; Struebig *et al.* 2011) grâce à l'utilisation d'indices de diversité analogues entre les deux disciplines (Tableau E10).

Tableau E10. **Tableau des équivalences des indices utilisés pour étudier la diversité génétique et la diversité spécifique** (tiré de Robuchon 2014)

Indice de comparaison	Diversité génétique	Diversité spécifique
Diversité α	Richesse allélique (nombre d'allèles) Hétérozygotie attendue (H_e) $1 - \sum f_i^2$ ou f_i est la fréquence de l'allèle i dans la population	Richesse spécifique (nombre d'espèces) Indice de Simpson ($1 - \lambda$) $1 - \sum p_i^2$ ou p_i est la fréquence de l'espèce i dans la communauté
Diversité β (Evanno <i>et al.</i> 2009)	Structure génétique (F_{st}) $\sigma_a^2 / (\sigma_a^2 + \sigma_s^2 + \sigma_w^2)$ où σ_a^2 , σ_s^2 et σ_w^2 sont les composants de la variance génétique entre les populations, entre les individus et au sein des individus	Structure des communautés (F_{stc}) $\sigma_a^2 / (\sigma_a^2 + \sigma_s^2)$ où σ_a^2 et σ_s^2 sont les composants de la variance de la fréquence des espèces entre les populations, et entre les individus au sein des populations

Dans l'objectif **d'étudier l'importance et les conséquences de l'homogénéisation biotique, la classe des ascidies pourraient être particulièrement intéressante car composée de très nombreuses espèces introduites** présentant une diversité de traits d'histoire de vie et d'histoire d'introduction (Shenkar & Swalla 2011).

IV. Thème 3. Identifier les mécanismes d'isolement reproductif agissant *in situ* entre *C. intestinalis* et *C. robusta*

Les travaux de cette thèse ont mis en évidence la présence stable de *C. intestinalis* et *C. robusta* à une échelle régionale et leur coexistence à micro-échelle (cf. chap. 1 & 3). Par ailleurs, les deux espèces présentent des cycles de vie et de reproduction similaires et relativement synchrones. Associées au constat de leur interfertilité en laboratoire (Bouchemousse *et al.* 2015; Sato *et al.* 2014; Suzuki *et al.* 2005), ces données suggèrent que l'hybridation entre les deux espèces devrait être fréquemment observée dans les populations syntopiques. Cependant, les travaux issus de cette thèse (cf. chap. 3; Bouchemousse *et al.* 2015) ainsi que ceux publiés par Nydam & Harrison (2011) et Sato *et al.* (2014) montrent qu'il existe un très faible nombre d'hybrides F1 et de faibles taux de polymorphisme partagé dans les populations syntopiques ; ce polymorphisme étant majoritairement expliqué par des événements anciens d'introgession (chap. 4). **Ces résultats permettent de conclure à l'existence de barrières génétiques pré- et/ou post- zygotiques en milieu naturel.** La question qui se pose à présent est de déterminer quels sont les mécanismes d'isolement reproductif agissant *in situ* entre les deux espèces.

Comme décrit dans l'encadré 3, divers types de mécanismes d'isolement reproductif peuvent entrer en jeu. Ils sont présentés dans la Figure C.4 avec un classement selon le moment où ils interviennent au cours du cycle de vie (en particulier, avant ou après fécondation) et selon leur dépendance à l'environnement (mécanismes endogènes ou exogènes).

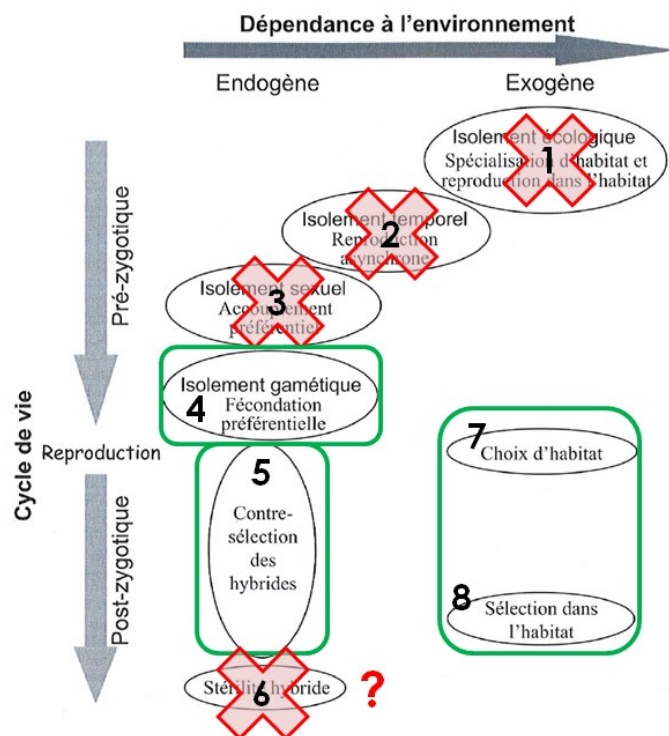


Figure C.4. Classification des mécanismes reproductifs pouvant jouer sur l'hybridation entre *C. robusta* et *C. intestinalis* dans les populations syntopiques. Les mécanismes barrés d'une croix rouge sont ceux que nous pouvons exclure sur la base de données de la littérature ou des résultats obtenus au cours de cette thèse. Les mécanismes entourés par un cadre vert sont envisageables à ce jour. Figure modifiée de Ravigné *et al.* (2010).

Concernant *C. robusta* et *C. intestinalis*, plusieurs mécanismes agissant avant la reproduction peuvent être d'ores et déjà éliminés. En effet, la syntopie avérée et la présence d'individus sexuellement matures simultanément chez les deux espèces (chap. 1 & 3) permettent d'éliminer l'hypothèse d'un isolement écologique ou temporel (no.1 & no.2, Figure C.4). Par ailleurs, les adultes sont sessiles et la fécondation est externe (émission des gamètes mâles et femelles dans la colonne d'eau). Donc des mécanismes de type comportemental (ex. choix de

partenaires avec parade nuptiale) ou mécanique (ex. morphologie des organes reproducteurs) ne peuvent pas être envisagés (no.3, Figure C.4). **La fécondation préférentielle (ou compétition gamétique) pourrait en revanche être un mécanisme d'isolement reproductif envisageable** (no.4, Figure C.4). Ce mécanisme, qui limite fortement les croisements hétérospécifiques par rapport aux croisements homo-spécifiques pourrait expliquer le faible nombre d'individus hybrides de première génération observé *in situ*. La reconnaissance entre gamètes conspécifiques est un mécanisme important chez les invertébrés benthiques à fécondation externe (Palumbi 1994). Des mécanismes tels que la chemotaxie des spermatozoïdes ou impliquant des protéines de reconnaissance gamétiques jouent un rôle fondamental dans la reconnaissance entre gamètes d'une même espèce (Evans & Sherman 2013). Par exemple, Geyer et Palumbi (2005) ont montré des fécondations préférentielles entre les gamètes conspécifiques de deux espèces d'oursin (*Echinometra oblonga* et *E. sp. C*) lorsque ces derniers étaient mélangés ; alors que des croisements uniquement hétérospécifiques (sans présence de gamètes homosspécifiques) montraient des taux de fécondation élevés. Des fécondations préférentielles en condition de compétition gamétique ont également été mises en évidence entre les gamètes des moules *M. edulis* et *M. galloprovincialis* (Bierne *et al.* 2002). Les croisements hétérospécifiques fonctionnent également entre les deux espèces de ciones (Suzuki *et al.* 2005; Bouchemousse *et al.* 2015) mais nous n'avons aucune donnée montrant qu'en conditions de compétition gamétique, le même résultat serait obtenu. **Des expériences de compétition gamétique, mélangeant des gamètes de *C. robusta* et *C. intestinalis* sont à réaliser pour évaluer l'importance de ce mécanisme dans l'isolement reproductif entre les deux espèces.**

De nombreux mécanismes interviennent également en phase post-fécondation. Pour expliquer le faible nombre d'hybrides observés au stade adulte, nous pourrions envisager une **contre-sélection des hybrides F1 du fait de mécanismes endogènes (génétiques) ou d'une contre-sélection dans l'habitat (exogène)** au cours des premiers stades du cycle de vie.

Les résultats préliminaires obtenus au cours du stage de master 2 d'Aurélien Courteille, qui a étudié la diversité génétique de juvéniles récupérés sur les dispositifs expérimentaux utilisés en 2013 (chap. 2), donnent quelques indications à ce sujet. Ses résultats semblent indiquer une absence d'hybride F1 au stade juvénile dans les 3 localités où les deux espèces étaient en syntopie. Ils montrent donc des résultats similaires à ceux observés chez les adultes (chap. 3 & 4) suggérant que, **si contre-sélection des hybrides F1 il y a, ce processus se déroulerait en amont de la sédentarisation, par exemple en phase larvaire**. La phase larvaire mobile des espèces à cycle benthopélagique est considérée comme particulièrement critique (i.e. sensible à la prédation, aux variations environnementales, à l'hydrodynamisme local etc.; Svane & Havenhand 1993; Carmen Pineda *et al.* 2012). **Des échantillonnages et analyses moléculaires de larves collectées *in situ* seraient à réaliser pour évaluer le taux d'hybrides F1 à ce stade et le comparer à ceux observés chez les juvéniles et adultes**. Il y a toutefois de nombreuses difficultés méthodologiques à surmonter, telles que, le tri de larves de ciones parmi l'ensemble des larves récoltées *in situ*, leur identification sur critères morphologiques (Pennati *et al.* 2015), ou mitochondriaux puisque nous avons montré une très forte association entre les caractères morphologiques et le type mitochondrial (chap. 3), puis leur analyse individuelle par les marqueurs moléculaires diagnostics bien choisis.

Une autre explication à l'absence d'hybrides F1 dans nos données pourraient être un problème d'échantillonnage, si les hybrides F1 ne sédentarisent pas à proximité des ou sous les pontons où ont été effectués nos échantillonnages. En effet, nous savons que les environnements portuaires sont constitués d'habitats différenciés par des facteurs environnementaux tels que le courant, la bathymétrie, la luminosité etc. Or ces facteurs, ainsi que différents signaux chimiques (par exemple des molécules émises par des individus conspécifiques) influencent le succès de la sédentarisation (ex. chez *C. robusta*; Rius *et al.* 2010). **Il n'est ainsi pas exclu qu'il y ait une sélection d'habitat (no. 7 et 8, Figure C.4) par les larves lors de leur métamorphose et sédentarisation et que les critères de sélection d'habitat diffèrent entre les hybrides et les**

populations parentales. Il serait intéressant de mener des études expérimentales comparant le comportement des larves de *C. intestinalis*, *C. robusta* et de leurs hybrides en fonction de différents facteurs environnementaux et substrats pour tester cette hypothèse.

Des mécanismes endogènes génétiques sont également à considérer. Nous avons montré l'absence, en populations naturelles, d'individus issus de croisements récents de type F2 ou backcross (chapitre 4). Ce résultat pourrait s'expliquer tout simplement par **la stérilité des hybrides (no. 6, Figure C.4), une hypothèse que nous pouvons éliminer sur la base de résultats obtenus en laboratoire.** Sato *et al.* (2014) ont mis en évidence la viabilité et la fertilité d'individus hybrides F1. Cependant, nous ne pouvons pas nous baser sur ce seul résultat, puisque les croisements hétérospécifiques réalisés dans cette étude impliquaient deux individus de chaque espèce. En l'absence d'analyses de parenté confirmant que le croisement est bien hétérospécifique, il est difficile d'exclure l'hypothèse de contaminations spermatiques ayant conduit à des descendants homospécifiques (comme cela a pu être déjà observé par l'équipe d'accueil à l'issue de certains croisements supposés hétérospécifiques). Toutefois, des descendants de backcross, pour lesquels les parentés ont été contrôlées, ont été obtenus dans le laboratoire d'accueil (Projet ANR HYSEA, données non publiées), indiquant que des hybrides F1 peuvent être fertiles et des reproducteurs efficaces en conditions expérimentales.

Un autre mécanisme endogène à considérer est **la présence d'incompatibilités génétiques de type Dobzhansky-Muller** (Orr 1995). Ces incompatibilités correspondent à des combinaisons alléliques particulières entre locus qui sont contre-sélectionnées chez les individus issus d'hybridation les présentant (Figure C.5).

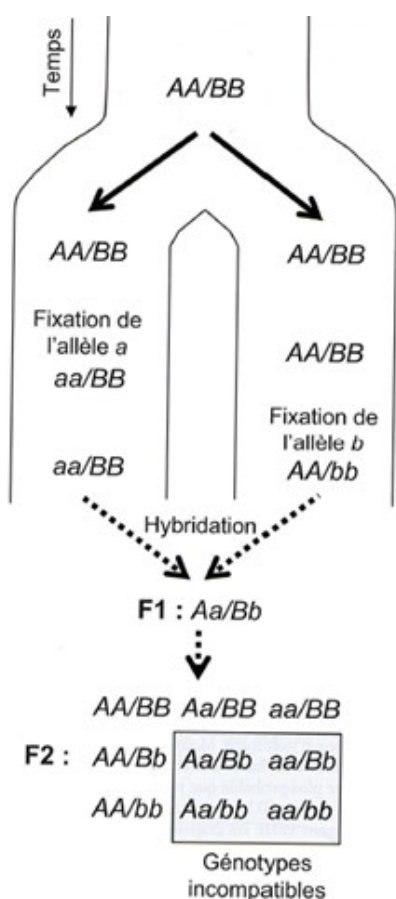


Figure C.5. **Représentation schématique du modèle à deux locus (locus « A » et locus « B ») d'évolution de l'isolement post-zygotique de Dobzhansky-Muller.** Deux lignées divergent indépendamment d'une lignée ancestrale unique (génotype aux deux locus AA/BB) et fixent différenciellement des allèles au cours du temps (l'allèle a au locus « A » pour la lignée à gauche et l'allèle b au locus B pour la lignée à droite). Lors de leur remise en contact, l'hybridation entre les deux lignées produit un génotype de type hybride F1 (i.e. hétérozygote aux deux locus). En F2, 9 combinaisons génétiques sont théoriquement possibles dont 4 impliquant les allèles apparus dans chacune des lignées divergentes ; ces 4 combinaisons sont formés de génotypes incompatibles aux deux locus : les combinaisons des allèles a et b sont incompatibles ou entraînent une diminution de la valeur sélective des individus hybrides F2 (i.e. dépression d'hybridation). Source : Ravigné *et al.* (2010).

Dobzhansky (1937) et Muller (1942) ont proposé que les allèles responsables de la dépression d'hybridation soient avantageux dans le fond génétique où ils sont apparus, mais délétères lorsqu'ils sont mélangés aux allèles de l'autre espèce. De telles incompatibilités génétiques ont été mises en évidence empiriquement, par exemple chez des individus F2 issus de

croisements entre les moules *Mytilus edulis* et *M. galloprovincialis* (Bierne *et al.* 2006). L'analyse de la ségrégation de marqueurs nucléaires chez des hybrides F2 obtenus en laboratoire a montré la contre-sélection des hybrides présentant une combinaison d'allèles de type homozygote-homozygote (i.e. génotypes aa/bb et AA/BB, voir pour plus de détails Bierne *et al.* (2006)). Sur la cône, des constructions de lignées F2 ont été déjà tentées par l'équipe d'accueil pour essayer de mettre en évidence de tels processus mais comme précisé plus haut, des contaminations spermatiques ont empêché **la construction de F2 double hybride, un stade permettant plus facilement la détection d'incompatibilités de type Dobzhansky-Muller**. De nouvelles lignées sont en cours de construction pour être analysées avec des marqueurs de type Rad-Seq (« restriction site associated DNA »-Sequence, voir Metzker (2010) pour une revue), permettant une très forte couverture du génome. Cette méthode devrait permettre d'identifier les régions génomiques impliquées dans ces incompatibilités, y compris des régions qui pourraient être des « îlots de divergence génomique » (i.e. terme anglo-saxons « genomic island of speciation »; Turner *et al.* 2005).

Ainsi même si nous avons pu éliminer différents mécanismes d'isolement reproductif entre *C. intestinalis* et *C. robusta*, il en reste encore de nombreux autres à étudier, des études impliquant la combinaison entre approches expérimentales et/ou moléculaires.

V. Thème 4 : (Ré-) Evaluer le statut d'espèces au sein du genre *Ciona* par des approches moléculaires

Un des objectifs initial de cette thèse était d'évaluer l'importance de l'hybridation entre *C. intestinalis* et *C. robusta*, deux espèces congénériques ayant été mises en contact récemment par des processus d'introduction biologique. La (quasi-)absence d'hybridation contemporaine entre les deux espèces est un des résultats majeurs de cette thèse. Une des explications est un isolement reproductif en lien avec leur ancienne divergence, estimée à 2.7 - 5.5 millions d'années (Roux *et al.* 2013). Cette divergence ancienne est également soulignée dans des analyses phylogénétiques basées sur différents marqueurs (Caputi *et al.* 2007; Nydam & Harrison 2007, 2010; Figure C.6). **Il existe toutefois au sein du genre *Ciona* d'autres espèces présentant moins de divergence génétique entre elles. L'isolement reproductif entre ces espèces pourrait être incomplet et donc ces espèces pourraient être d'excellents modèles pour étudier les processus contemporains d'hybridation et d'introgession en milieu marin.** Cela pourrait être notamment le cas des espèces *C. robusta* et *C. edwardsi* Roule 1884 ou encore *C. robusta* et les taxons *C. intestinalis* type C et *C. intestinalis* type D (Figure C.6). Il est intéressant de constater que les espèces *C. robusta*, *C. edwardsi* et *C. intestinalis* type C ont toutes été observées ou décrites dans la zone Nord-Ouest du bassin Méditerranéen (Fiala-Medioni 1974; Nydam & Harrison 2007). Des séquençages mitochondriaux réalisés dans l'équipe d'accueil sur des individus échantillonnés par Sébastien Darras aux environs de la station de Banyuls sur Mer ont confirmé la présence en sympatrie de ces trois espèces (C. Roby, S. Darras & F. Viard, données non publiées), auxquelles il faut rajouter l'espèce *C. roulei*, également présente dans cette région. Ce « melting pot » d'espèces a, pour partie, une origine similaire à la situation observée entre *C. intestinalis* et *C. robusta* en Manche Occidentale, **à savoir l'introduction de l'espèce *C. robusta* dans le bassin Méditerranéen dans une zone où les espèces *C. edwardsi* et *C. intestinalis* type C sont actuellement considérées comme endémiques. Des travaux analogues à ceux réalisés au cours de cette thèse pourraient être envisagés sur ces trois espèces** pour mieux évaluer leur abondance relative *in situ*, leur potentiel d'hybridation, et, s'ils existent, mesurer les flux de gènes entre elles, en particulier entre l'espèce non-indigène et les deux espèces endémiques.

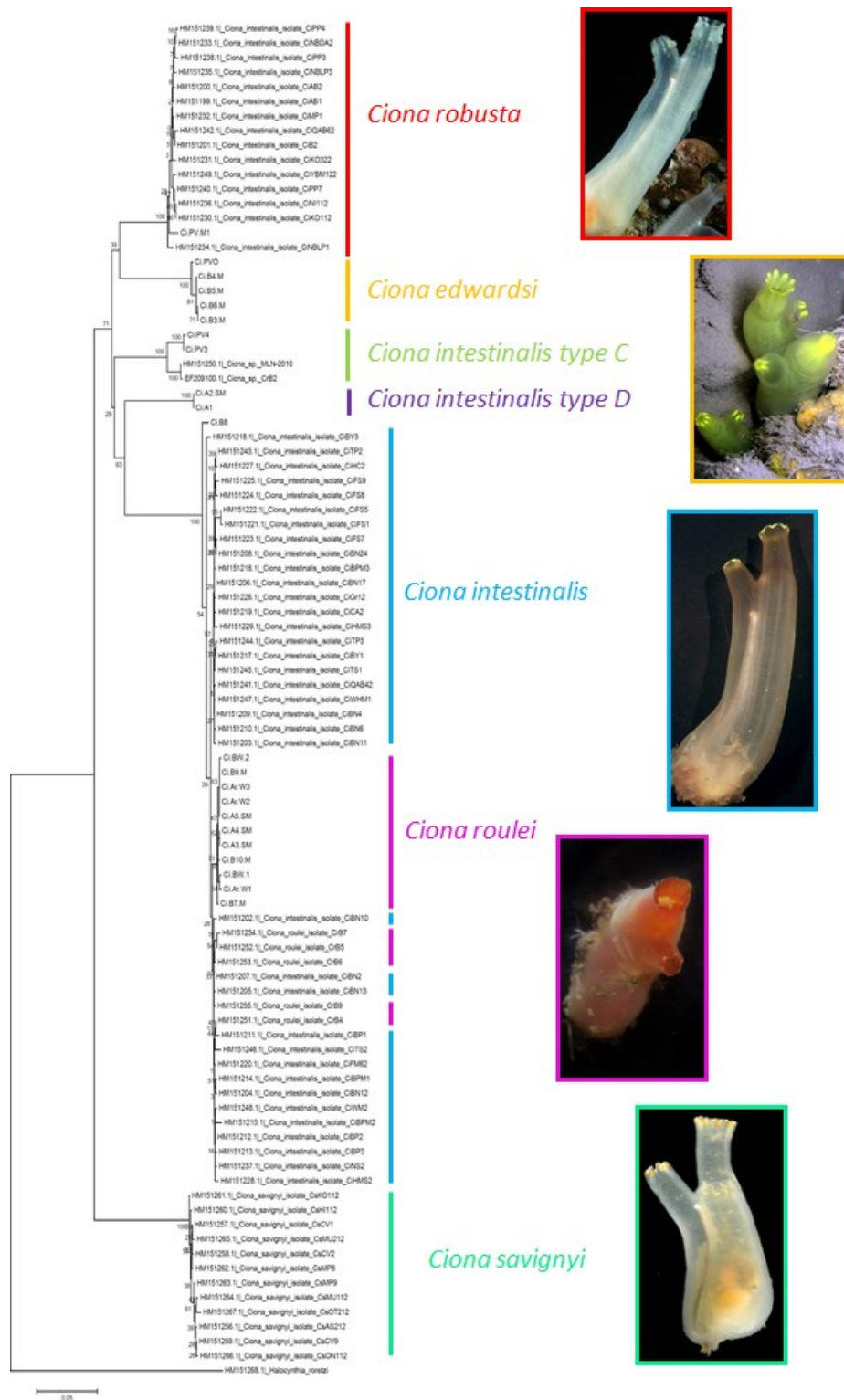


Figure C.6. Arbre phylogénétique de type Neighbor-Joining, construit à partir de 744 paires de bases de la séquence mitochondriale codant pour la sous-unité 1 de la cytochrome oxydase (mtCOI), montrant les distances génétiques entre plusieurs espèces du genre *Ciona* présentes en Manche et en Méditerranée. L'espèce servant de groupe externe est *Halocynthia roretzi*. Les séquences avec un nom court sont issues du laboratoire d'accueil et proviennent d'échantillons collectés par Sébastien Darras aux environs de Banyuls sur Mer, à l'exception des deux spécimens de *C. intestinalis* type D, d'origine inconnue, qui ont été collectés dans l'aquarium de Banyuls sur Mer (C. Roby, S. Darras & F. Viard, données non publiées). Les autres séquences proviennent des travaux de Nydam & Harrison (2007).

Une autre situation particulièrement intéressante à étudier est celle représentée par les espèces *C. intestinalis* et *C. roulei* Lahille, 1887. La situation est ici complètement opposée à celle décrite pour *C. robusta* et *C. intestinalis*, espèces encore récemment considérées comme cryptiques malgré leur forte divergence évolutive. *C. intestinalis* et *C. roulei* sont taxonomiquement acceptées comme deux espèces distinctes. Elles présentent en effet des caractères morphologiques diagnostiques (i.e. *C. roulei* possédant une tunique beaucoup plus épaisse et un siphon inhalant plus court que *C. intestinalis* ainsi qu'un tissu pharyngial de couleur rouge-orangé, Figure C.6). En outre, elles présentent des distributions géographiques disjointes : *C. roulei* est décrite exclusivement dans la zone Nord-Ouest du bassin Méditerranéen alors que *C. intestinalis* est décrite dans l'Atlantique Nord, et aucune situation de sympatrie n'a encore été mise en évidence. Pourtant les deux espèces montrent très peu de divergence génétique, avec une valeur de 0.7% pour le locus mitochondrial COI ; une valeur proche de la divergence intraspécifique de chacune des deux espèces (i.e. 0.7% au sein de *C. intestinalis* et 0.4% au sein de *C. roulei* ; Nydam & Harrison 2007). Cette similarité mitochondriale est illustrée dans l'arbre phylogénétique de la figure C.6. Il en est de même pour les 6 autres marqueurs nucléaires étudiés par Nydam & Harrison (2010). Par ailleurs, des données préliminaires obtenues avec 658 marqueurs de type SNPs (obtenus par Rad-Seq) suggèrent que les populations de *C. intestinalis* échantillonnées en Norvège et Suède sont plus différenciées entre elles que *C. roulei* ne peut l'être des populations de *C. intestinalis* échantillonnées en Manche occidentale (Figure C.7 ; C. Roby, C. Daguin-Thiébaud, P.A. Gagnaire & F. Viard, données non publiées).

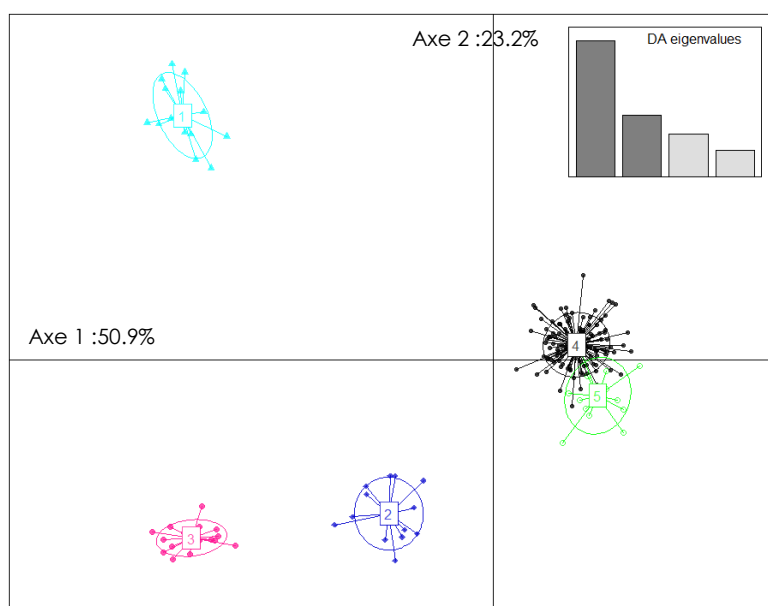


Figure C.7. Résultat d'une DAPC (analyse discriminante) illustrant la faible divergence génomique entre *C. roulei* (groupe 5 en vert clair) et *C. intestinalis* (autres groupes).

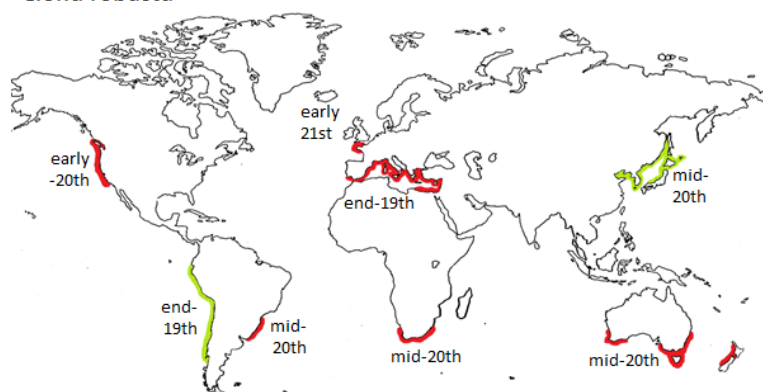
L'analyse concerne 170 individus de *C. intestinalis* provenant de Suède et Norvège (Groupes 1, 2 et 3) et de Manche Occidentale (Groupe 4) et de 12 individus de *C. roulei* provenant de Banyuls sur Mer (Groupe 5), génotypés sur 658 marqueurs de type SNP.

Source : graphique réalisé par C. Roby

Enfin, Lambert *et al.* (1990) avait montré la possibilité de croisements entre *C. roulei* et *C. robusta* (à l'époque nommée *C. intestinalis*) mais uniquement dans le sens du croisement utilisant des ovocytes de *C. roulei* et du sperme de *C. robusta*. Ce sens de croisement est identique à celui générant des hybrides entre *C. robusta* et *C. intestinalis* en laboratoire (Suzuki *et al.* 2005; Bouchemousse *et al.* 2015). La question du statut d'espèces distinctes de *C. intestinalis* et *C. roulei* se pose donc. **On peut en effet, à ce stade, faire l'hypothèse que ces deux espèces soient deux populations (faiblement) structurées de part et d'autre de la zone entre la Mer Méditerranée et l'Atlantique**, à l'instar de ce qui a été décrit chez d'autres espèces marines (Patarnello *et al.* 2007; Tine *et al.* 2014). **Il serait dans ce contexte intéressant de poursuivre les analyses de génomique des populations sur ces taxons et déterminer si elles sont isolées reproductivement. Si tel n'est le cas, une réévaluation taxonomique de ces deux espèces pourrait être envisagée.**

Deux autres espèces du genre mériteraient des études plus poussées notamment concernant leur histoire évolutive et leur délimitation : il s'agit des espèces *C. gelatinosa* Bonnevie, 1896 et *C. longissima* Hartmeyer, 1899. Leur place dans la phylogénie du genre n'a pas encore été établie et elles pourraient permettre de mieux comprendre l'origine de la distribution amphi-Atlantique actuelle de *C. intestinalis*. En effet, l'analyse phylogéographique de *C. robusta* et *C. intestinalis* à l'échelle mondiale nous a conduit à nous poser des questions sur le statut de ces espèces dans certaines régions géographiques dans lesquelles elles ont été décrites (chap. 5). Ces nouvelles hypothèses sont présentées dans la figure C.8.

Ciona robusta



Ciona intestinalis

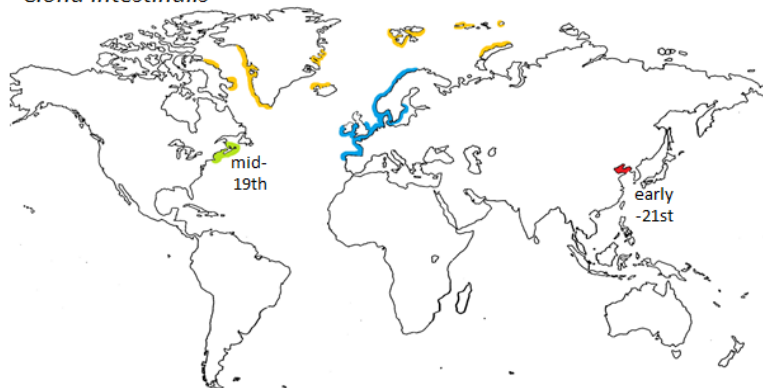


Figure C.8. Distribution mondiale et statut (indigène, non-indigène, cryptogénique) proposé pour *Ciona robusta* et *C. intestinalis*.

En bleu sont représentées les régions où les deux taxons sont certainement indigènes, en rouge les régions où elles sont certainement non-indigènes et en vert, les régions pour lesquelles le statut proposé est celui d'un taxon cryptogénique (i.e. statut non défini). En effet, à la suite des résultats de cette thèse, le statut d'espèce non-indigène des deux espèces dans certaines régions a été questionné et un statut d'espèce cryptogénique est proposé pour *C. robusta* au Chili et *C. intestinalis* sur la côte Est nord-américaine.

La distribution des espèces *C. gelatinosa* et *C. longissima* est également représentée en orange clair sur la carte de *C. intestinalis* (données issues de Dybern (1965) et Millar (1966)).

Concernant *C. robusta*, le nombre élevé d'haplotypes privés dans le Pacifique Sud-Est et les dates de premières observations de *C. robusta* au Chili nous a en effet conduit à émettre l'hypothèse d'un statut indigène de l'espèce *C. robusta* dans le Pacifique Sud-Est (Figure C.8), qui par ailleurs montre une histoire d'introggression différente de celle observée dans les populations européennes (chap. 4). Nous avons donc considéré que *C. robusta* est cryptogénique dans cette région. Pour aller plus loin sur cette question, il serait intéressant d'analyser les schémas d'introggression dans les populations du Pacifique dans son ensemble. Concernant *C. intestinalis*, nous avons proposé que cette espèce puisse être indigène de la côte Est Américaine. L'approche Bayésienne réalisée au cours de cette thèse (chap. 5) suggère en effet que la distribution amphi-Atlantique disjointe de *C. intestinalis* pourrait être d'origine naturelle et résulter d'une divergence entre deux groupes d'individus datant de 27,000 ans, une date correspondant aux événements climatiques survenus lors du dernier maximum glaciaire (LGM). La Nouvelle-Écosse, zone où *C. intestinalis* est présente, a d'ailleurs été décrite comme l'un des seuls refuges d'espèces de la côte Nord-Américaine lors du LGM (Maggs et al. 2008). Nous n'avons toutefois pas exclu que les populations établies le long de la côte Est Américaine puissent également résulter d'introductions biologiques récentes. Nous confirmons donc le statut d'espèce cryptogénique de *C. intestinalis* dans cette région (Figure C.8), à l'instar ce qu'avait proposé Deniz Haydar en 2012 sur la base de données de distribution de plus de 1000 espèces

d'invertébrés marins (i.e. ascidies, bivalves et hydrozoaires) de l'Atlantique Nord. Dans cette étude, Haydar (2012) montre que 20% des espèces sont présentes sur les deux côtes de l'Atlantique Nord soit avec une distribution amphi-Atlantique continue soit une distribution disjointe (i.e. absente des régions côtières arctiques). *C. intestinalis* fait actuellement partie de cette dernière catégorie. Néanmoins, il faut noter que *C. intestinalis* pourrait en fait avoir une distribution amphi-Atlantique complète mais non décrite. En effet, deux espèces précédemment considérées comme des morphotypes particuliers de *C. intestinalis* (Berrill 1950; Millar 1966) mais dont le statut d'espèce est accepté dans WoRMS, sont présentes dans les zones Arctiques : *C. gelatinosa* et *C. longissima* (Figure C.8). Une approche de phylogénie serait à réaliser pour évaluer la position de ces espèces dans l'arbre phylogénétique du genre *Ciona*. Si ces deux espèces devaient être en position monophylétique avec *C. intestinalis* (à l'image de ce qui a été montré entre *C. roulei* et *C. intestinalis*), nous pourrions proposer que *C. intestinalis* présente bel et bien une distribution amphi-Atlantique continue.

En résumé, plusieurs espèces ou taxons du genre *Ciona* mériteraient une étude plus approfondie de leurs relations phylogénétiques. Le développement de Rad-Seq chez *C. intestinalis* et *C. robusta* a été entrepris par l'équipe d'accueil, en collaboration avec P.A. Gagnaire et N. Bierne (SMEL - ISEM). Il serait intéressant de poursuivre ces travaux en les étendant aux autres espèces du genre. Les marqueurs de type Rad-Seq peuvent en effet être utilisés également pour **des analyses phylogénomiques** (Pante *et al.* 2015b). Ces approches menées sur les taxons présents dans l'Atlantique et la Méditerranée pourraient permettre d'établir l'histoire évolutive, (ré-)évaluer le statut taxonomique et tester l'hypothèse d'évolution réticulée et de transferts de gènes entre ces taxons ou espèces.

En conclusion, les questions abordées ont largement évolué au cours de cette thèse. Initialement, elles concernaient deux espèces cryptiques et la caractérisation d'introgessions adaptatives pouvant faciliter l'installation durable de l'espèce non-indigène. **Ce travail s'achève en s'interrogeant sur les processus permettant la coexistence de deux espèces formellement acceptées et isolées reproductivement *in situ*, ainsi que sur la réalité de leur statut d'espèces non-indigènes dans certaines régions.** Ces travaux de thèse, associés aux nombreux nouveaux résultats en écologie et biologie évolutive récemment publiés sur le genre *Ciona*, et en particulier *C. intestinalis* et *C. robusta*, illustrent la complexité de délimiter des espèces et de définir un statut d'espèce indigène ou non-indigène, pourtant deux attributs importants pour réaliser des études en écologie et biologie de l'évolution. Ces espèces ne sont pas les seules à représenter un défi pour des études éco-évolutives. L'espèce nominale *Diplosoma listerianum* (Perez-Portela *et al.* 2013) ou encore *Botryllus schlosseri* (Bock *et al.* 2012) font également partie de cette catégorie d'espèces chez lesquelles la taxonomie, l'histoire évolutive et l'histoire de la colonisation à une échelle mondiale restent encore complexe à élucider. **Ces différents travaux témoignent de l'importance des effets conjugués de processus anciens et actuels sur la distribution, la composition génétique et le devenir des espèces.**

- Références bibliographiques – (hors articles)

-A-

- Abbott R, Albach D, Ansell S, *et al.* (2013) Hybridization and speciation. *Journal of Evolutionary Biology* **26**, 229-246.
- Adler PB, HilleRisLambers J, Levine JM (2007) A niche for neutrality. *Ecology Letters* **10**, 95-104.
- Airoldi L, Turon X, Perkol-Finkel S, Rius M (2015) Corridors for aliens but not for natives: effects of marine urban sprawl at a regional scale. *Diversity and Distributions* **21**, 755-768.
- Aldred N, Clare AS (2014) Mini-review: Impact and dynamics of surface fouling by solitary and compound ascidians. *Biofouling* **30**, 259-270.
- Allendorf FW, Leary RF, Spruell P, Wenburg JK (2001) The problems with hybrids: setting conservation guidelines. *Trends in Ecology & Evolution* **16**, 613-622.
- Anderson MJ (2001) A new method for non-parametric multivariate analysis of variance. *Austral Ecology* **26**, 32-46.
- Anderson MJ, Gorley RN, Clarke KR (2008) PERMANOVA+ or PRIMER; Guide to software and statistical methods, Plymouth UK.
- Appeltans W, Ahyoung ST, Anderson G, Angel MV, Artois T (2012) The magnitude of global marine species diversity. *Current Biology* **22**, 2189-2202.
- Arenas F, Bishop JDD, Carlton JT, *et al.* (2006) Alien species and other notable records from a rapid assessment survey of marinas on the south coast of England. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* **86**, 1329-1337.
- Audet D, Davis DS, Miron G, *et al.* (2003) Geographical expansion of a nonindigenous crab, *Carcinus maenas* (L.), along the Nova Scotian shore into the southeastern Gulf of St. Lawrence, Canada. *Journal of Shellfish Research* **22**, 255-262.
- Avice JC (1992) Molecular population structure and the biogeographic history of a regional fauna: A case history with lessons for conservation biology. *Oikos* **63**, 62-76.
- Avice JC (2000) Phylogeography: The history and formation of species. Harvard University Press pp. 447.

-B-

- Baer J, Stengel DB (2010) Variability in growth, development and reproduction of the non-native seaweed *Sargassum muticum* (Phaeophyceae) on the Irish west coast. *Estuarine Coastal and Shelf Science* **90**, 185-194.
- Bailey SA (2015) An overview of thirty years of research on ballast water as a vector for aquatic invasive species to freshwater and marine environments. *Aquatic Ecosystem Health and Management* **18**, 1-8.
- Bank C, Buerger R, Hermisson J (2012) The limits to parapatric speciation: Dobzhansky-Muller incompatibilities in a continent-island model. *Genetics* **191**, 845-863.
- Barberousse A, Samadi S (2010) Species from Darwin onward. *Integrative Zoology* **5**, 187-197.
- Barrett RDH, Schluter D (2008) Adaptation from standing genetic variation. *Trends in Ecology & Evolution* **23**, 38-44.
- Barton NH, Hewitt GM (1985) Analysis of hybrid zones. *Annual Review of Ecology and Systematics* **16**, 113-148.
- Bates AE, Barrett NS, Stuart-Smith RD, *et al.* (2014) Resilience and signatures of tropicalization in protected reef fish communities. *Nature Climate Change* **4**, 62-67.
- Beaumont MA, Zhang WY, Balding DJ (2002) Approximate Bayesian computation in population genetics. *Genetics* **162**, 2025-2035.
- Becquet V, Simon-Bouhet B, Pante E, Hummel H, Garcia P (2012) Glacial refugium versus range limit: Conservation genetics of *Macoma balthica*, a key species in the Bay of Biscay (France). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* **432**, 73-82.
- Berrill NJ (1950) The Tunicata with an account of the British species, pp. 354 Royal Society, London.
- Bierne N, David P, Boudry P, Bonhomme F (2002) Assortative fertilization and selection at larval stage in the mussels *Mytilus edulis* and *M. galloprovincialis*. *Evolution* **56**, 292-298.
- Bierne N, Bonhomme F, David P (2003) Habitat preference and the marine-speciation paradox. *Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences* **270**, 1399-1406.

- Bierne N, Bonhomme F, Boudry P, Szulkin M, David P (2006) Fitness landscapes support the dominance theory of post-zygotic isolation in the mussels *Mytilus edulis* and *M. galloprovincialis*. *Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences* **273**, 1253-1260.
- Bierne N, Welch J, Loire E, Bonhomme F, David P (2011) The coupling hypothesis: why genome scans may fail to map local adaptation genes. *Molecular Ecology* **20**, 2044-2072.
- Bishop JDD, Roby C, Yunnice ALE, *et al.* (2013) The Southern Hemisphere ascidian *Asterocarpa humilis* is unrecognised but widely established in NW France and Great Britain. *Biological Invasions* **15**, 253-260.
- Bishop JDD, Wood CA, Leveque L, Yunnice ALE, Viard F (2015) Repeated rapid assessment surveys reveal contrasting trends in occupancy of marinas by non-indigenous species on opposite sides of the western English Channel. *Marine Pollution Bulletin* **95**, 699-706.
- Bishop MWH (1947) Establishment of an immigrant barnacle in British coastal waters. *Nature* **159**, 501-502.
- Blackburn TM, Pysek P, Bacher S, *et al.* (2011) A proposed unified framework for biological invasions. *Trends in Ecology & Evolution* **26**, 333-339.
- Blackburn TM, Lockwood JL, Cassey P (2015) The influence of numbers on invasion success. *Molecular Ecology* **24**, 1942-1953.
- Blakeslee AMH, McKenzie CH, Darling JA, *et al.* (2010) A hitchhiker's guide to the Maritimes: anthropogenic transport facilitates long-distance dispersal of an invasive marine crab to Newfoundland. *Diversity and Distributions* **16**, 879-891.
- Bock DG, Zhan A, Lejeune C, MacIsaac HJ, Cristescu ME (2011) Looking at both sides of the invasion: patterns of colonization in the violet tunicate *Botrylloides violaceus*. *Molecular Ecology* **20**, 503-516.
- Bock DG, MacIsaac HJ, Cristescu ME (2012) Multilocus genetic analyses differentiate between widespread and spatially restricted cryptic species in a model ascidian. *Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences* **279**, 2377-2385.
- Bohn T, Amundsen PA (2001) The competitive edge of an invading specialist. *Ecology* **82**, 2150-2163.
- Bohn T, Amundsen P-A, Sparrow A (2008) Competitive exclusion after invasion? *Biological Invasions* **10**, 359-368.
- Borsa P, Daguin C, Bierne N (2007) Genomic reticulation indicates mixed ancestry in Southern-Hemisphere *Mytilus* spp. mussels. *Biological Journal of the Linnean Society* **92**, 747-754.
- Borsa P, Rolland V, Daguin-Thiebaut C (2012) Genetics and taxonomy of Chilean smooth-shelled mussels, *Mytilus* spp. (Bivalvia: Mytilidae). *Comptes Rendus Biologies* **335**, 51-61.
- Bouchemousse S, Lévêque L, Dubois G, Viard F (2015) Co-occurrence and reproductive synchrony do not ensure hybridization between an alien tunicate and its interfertile native congener. *Evolutionary Ecology*, 1-19, doi: 10.1007/s10682-015-9788-1 **in press**
- Brannock PM, Wetthey DS, Hilbish TJ (2009) Extensive hybridization with minimal introgression in *Mytilus galloprovincialis* and *M. trossulus* in Hokkaido, Japan. *Marine Ecology Progress Series* **383**, 161-171.
- Briggs JC (2003) Marine centres of origin as evolutionary engines. *Journal of Biogeography* **30**, 1-18.
- Briski E, Ghabooli S, Bailey SA, MacIsaac HJ (2012) Invasion risk posed by macroinvertebrates transported in ships' ballast tanks. *Biological Invasions* **14**, 1843-1850.
- Britton-Davidian J, Fel-Clair F, Lopez J, Alibert P, Boursot P (2005) Postzygotic isolation between the two European subspecies of the house mouse: estimates from fertility patterns in wild and laboratory-bred hybrids. *Biological Journal of the Linnean Society* **84**, 379-393.
- Brown JH (1984) On the relationship between abundance and distribution of species. *The American Naturalist* **124**, 255-279.
- Brown JH, Stevens G, Kaufman D (1996) The geographic range: size, shape, boundaries and internal structure. *Annual Review of Ecology and Systematics* **27**, 597-623.
- Brunetti R, Gissi C, Pennati R, *et al.* (2015) Morphological evidence that the molecularly determined *Ciona intestinalis* type A and type B are different species: *Ciona robusta* and *Ciona intestinalis*. *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research* **53**, 186-193.
- Bulleri F, Chapman MG (2010) The introduction of coastal infrastructure as a driver of change in marine environments. *Journal of Applied Ecology* **47**, 26-35.

-C-

- Caputi L, Andreakis N, Mastrototaro F, *et al.* (2007) Cryptic speciation in a model invertebrate chordate. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104**, 9364-9369.

- Caputi L, Crocetta F, Toscano F, Sordino P, Cirino P (2015) Long-term demographic and reproductive trends in *Ciona intestinalis* sp. A. *Marine Ecology* **36**, 118-128.
- Carlton JT (2000) Global change and biological invasions in the oceans. In: *Invasive species in a changing world* (eds. Mooney HA, Hobbs RJ), pp. 31-53. Island Press, Washington.
- Carlton JT (2001) Introduced species in U.S. coastal waters. In: *Environmental impacts and management priorities*. Pew Oceans Commission, Williams College and Mystic Seaport.
- Carlton JT (2009) Deep invasion ecology and the assembly of communities in historical time. In: *Biological invasions in marine ecosystems: Ecological, management and geographic perspectives* (eds. Rilov G, Crooks JA), pp. 13-56. Springer-Verlag, Berlin, Germany.
- Carmen Pineda M, McQuaid CD, Turon X, *et al.* (2012) Tough adults, frail babies: An analysis of stress sensitivity across early life-history stages of widely introduced marine invertebrates. *Plos One* **7**, e46672.
- Carver CE, Mallet AL, Vercaemer B (2006) Biological synopsis of the solitary tunicate *Ciona intestinalis*. *Canadian Manuscript Report of Fisheries and Aquatic Sciences* **2746**.
- Cayer L (1999) Tunicate fouling in Nova Scotia aquaculture: a new development. *Journal of Shellfish Research* **18**, 327.
- Chan FT, MacIsaac HJ, Bailey SA (2015) Relative importance of vessel hull fouling and ballast water as transport vectors of nonindigenous species to the Canadian Arctic. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* **72**, 1230-1242.
- Chapman JW, Blakeslee AMH, Carlton JT, Bellinger MR (2008) Parsimony dictates a human introduction: on the use of genetic and other data to distinguish between the natural and human-mediated invasion of the European snail *Littorina littorea* in North America. *Biological Invasions* **10**, 131-133.
- Clarke CL, Theriault TW (2007) Biological synopsis of the invasive tunicate *Styela clava* (Herdman 1881). *Canadian Manuscript Report of Fisheries and Aquatic Sciences* **2807**.
- Clarke KR, Warwick RM (2001) *Change in marine communities: an approach to statistical and interpretation*, 2nd edition edn., Plymouth, UK.
- Colautti RI, Grigorovich IA, MacIsaac HJ (2006) Propagule pressure: A null model for biological invasions. *Biological Invasions* **8**, 1023-1037.
- Colautti RI, MacIsaac HJ (2004) A neutral terminology to define 'invasive' species. *Diversity and Distributions* **10**, 135-141.
- Colautti RI, Richardson DM (2009) Subjectivity and flexibility in invasion terminology: too much of a good thing? *Biological Invasions* **11**, 1225-1229.
- Coleman RR, Gaither MR, Kimokeo B, *et al.* (2014) Large-scale introduction of the Indo-Pacific damselfish *Abudefduf vaigiensis* into Hawaii promotes genetic swamping of the endemic congener *A. abdominalis*. *Molecular Ecology* **23**, 5552-5565.
- Comtet T, Sandionigi A, Viard F, Casiraghi M (2015) DNA (meta)barcoding of biological invasions: a powerful tool to elucidate invasion processes and help managing aliens. *Biological Invasions* **17**, 905-922.
- Connell SD (2001) Urban structures as marine habitats: an experimental comparison of the composition and abundance of subtidal epibiota among pilings, pontoons and rocky reefs. *Marine Environmental Research* **52**, 115-125.
- Cook EJ, Stehlikova J, Beveridge CM, *et al.* (2013) Distribution of the invasive bryozoan *Tricellaria inopinata* in Scotland and a review of its European expansion. *Aquatic Invasions* **8**, 281-288.
- Costelloe J, Keegan BF, Konnecker GF (1986) Rocky subtidal assemblages on the west coast of Ireland. *Hydrobiologia* **142**, 97-111.
- Coyne JA, Orr HA (2004) *Speciation*, Sunderland, MA: Sinauer Associates.
- Cristescu ME (2014) From barcoding single individuals to metabarcoding biological communities: towards an integrative approach to the study of global biodiversity. *Trends in Ecology & Evolution* **29**, 566-571.
- Cunningham CW (2008) How to use genetic data to distinguish between natural and human-mediated introduction of *Littorina littorea* to North America. *Biological Invasions* **10**, 1-6.

-D-

- Daguin C (2000) *Phylogéographie des moules du complexe d'espèces Mytilus edulis*. PhD thesis. Université Montpellier II, Montpellier.
- Dar PA, Reshi ZA (2014) Components, processes and consequences of biotic homogenization: A review. *Contemporary Problems of Ecology* **7**, 123-136.

- Darling JA, Blum MJ (2007) DNA-based methods for monitoring invasive species: a review and prospectus. *Biological Invasions* **9**, 751-765.
- Darling JA, Mahon AR (2011) From molecules to management: Adopting DNA-based methods for monitoring biological invasions in aquatic environments. *Environmental Research* **111**, 978-988.
- Dasmahapatra KK, Walters JR, Briscoe AD, *et al.* (2012) Butterfly genome reveals promiscuous exchange of mimicry adaptations among species. *Nature* **487**, 94-98.
- Davidson AM, Jennions M, Nicotra AB (2011) Do invasive species show higher phenotypic plasticity than native species and, if so, is it adaptive? A meta-analysis. *Ecology Letters* **14**, 419-431.
- de Queiroz K (1998) The general concept of species, species criteria, and the process of speciation. In: *Endless Forms: Species and Speciation* (eds. Howard DJ, Berlocher SH), pp. 57-75. Oxford University Press, Oxford.
- DeHaan PW, Schwabe LT, Ardren WR (2010) Spatial patterns of hybridization between bull trout, *Salvelinus confluentus*, and brook trout, *Salvelinus fontinalis* in an Oregon stream network. *Conservation Genetics* **11**, 935-949.
- Dehal P, Satou Y, Campbell RK, *et al.* (2002) The draft genome of *Ciona intestinalis*: Insights into chordate and vertebrate origins. *Science* **298**, 2157-2167.
- Dijoux L, Viard F, Payri C (2014) The more we search, the more we find: Discovery of a new lineage and a new species complex in the genus *Asparagopsis*. *Plos One* **9**, e103826.
- Dobzhansky T (1937) *Genetics and the origin of species* Colombia University Press, New York, NY.
- Dupont L, Viard F, David P, Bishop JDD (2007) Combined effects of bottlenecks and selfing in populations of *Corella eumyota*, a recently introduced sea squirt in the English Channel. *Diversity and Distributions* **13**, 808-817.
- Dupont L, Viard F, Dowell MJ, Wood C, Bishop JDD (2009) Fine- and regional-scale genetic structure of the exotic ascidian *Styela clava* (Tunicata) in southwest England, 50 years after its introduction. *Molecular Ecology* **18**, 442-453.
- Dupont L, Viard F, Davis MH, Nishikawa T, Bishop JDD (2010) Pathways of spread of the introduced ascidian *Styela clava* (Tunicata) in Northern Europe, as revealed by microsatellite markers. *Biological Invasions* **12**, 2707-2721.
- Dybern BI (1965) The life cycle of *Ciona intestinalis* (L.) f. *typica* in relation to the environmental temperature. *Oikos* **16**, 109-131.
- Dybern BI (1967) The distribution and salinity tolerance of *Ciona intestinalis* (L.) f. *typica* with special reference to the waters around Southern Scandinavia. *Ophelia* **4**, 207-226.
- Dybern BI (1969) Distribution and ecology of ascidians in Kvíturdvíkpollen and Vagsbopollen on West coast of Norway *Sarsia* **37**, 21-40.

-E-

- Edgell TC, Hollander J (2011) The evolutionary ecology of european green crab, *Carcinus maenas*, in North America. In: *In the Wrong Place - Alien Marine Crustaceans: Distribution, Biology and Impacts* (eds. Galil BS, Clark PF, Carlton JT), pp. 641-659. Springer, Dordrecht.
- Elkinton JS, Liebhold A, Boettner GH, Sremac M (2014) Invasion of *Operophtera brumata* in northeastern United States and hybridization with *O. bruceata*. *Biological Invasions* **16**, 2263-2272.
- Engelen AH, Serebryakova A, Ang P, *et al.* (2015) Circumglobal invasion by the brown seaweed *Sargassum muticum*. *Oceanography and Marine Biology: An Annual Review* **53**, 81-126.
- Evanno G, Castella E, Antoine C, Paillat G, Goudet J (2009) Parallel changes in genetic diversity and species diversity following a natural disturbance. *Molecular Ecology* **18**, 1137-1144.
- Evans JP, Sherman CDH (2013) Sexual selection and the evolution of egg-sperm interactions in broadcast-spawning invertebrates. *Biological Bulletin* **224**, 166-183.

-F-

- Facon B, Genton BJ, Shykoff J, *et al.* (2006) A general eco-evolutionary framework for understanding bioinvasions. *Trends in Ecology & Evolution* **21**, 130-135.
- Fiala-Medioni A (1974) Ascidians of the rocky benthos of Banyuls sur Mer: faunistic inventory and ecology notes. *Vie et Milieu* **24**, 193-207.
- Fitzpatrick BM, Fordyce JA, Niemiller ML, Reynolds RG (2012) What can DNA tell us about biological invasions? *Biological Invasions* **14**, 245-253.

- Fitzpatrick BM, Johnson JR, Kump DK, *et al.* (2010) Rapid spread of invasive genes into a threatened native species. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **107**, 3606-3610.
- Fontaine MC, Pease JB, Steele A, *et al.* (2015) Extensive introgression in a malaria vector species complex revealed by phylogenomics. *Science* **347**, 1258524.
- Fraisse C, Belkhir K, Welch J, Bierre N (2015) Local interspecies introgression is the main cause of extreme levels of intraspecific differentiation in mussels. *Molecular Ecology*, 1-18, doi: 10.1111/mec.13299 **in press**
- Franke HD, Gutow L, Janke M (2007) Flexible habitat selection and interactive habitat segregation in the marine congeners *Idotea baltica* and *Idotea emarginata* (Crustacea, Isopoda). *Marine Biology* **150**, 929-939.

-G-

- Gallo A, Silvestre F, Cuomo A, Papoff F, Tosti E (2011) The impact of metals on the reproductive mechanisms of the ascidian *Ciona intestinalis*. *Marine Ecology* **32**, 222-231.
- Gallon RK, Robuchon M, Leroy B, *et al.* (2014) Twenty years of observed and predicted changes in subtidal red seaweed assemblages along a biogeographical transition zone: inferring potential causes from environmental data. *Journal of Biogeography* **41**, 2293-2306.
- Galtier N, Nabholz B, Glemin S, Hurst GDD (2009) Mitochondrial DNA as a marker of molecular diversity: a reappraisal. *Molecular Ecology* **18**, 4541-4550.
- Gardner JPA (1994) The structure and dynamics of naturally occurring hybrid *Mytilus edulis* (Linnaeus 1758) and *Mytilus galloprovincialis* (Lamarck 1819) (Bivalvia, Mollusca) populations: Review and interpretation *Archiv Fur Hydrobiologie*, 37-71.
- Geller JB, Darling JA, Carlton JT (2010) Genetic perspectives on marine biological invasions. *Annual Review in Marine Science* **2**, 367-393.
- Geyer LB, Palumbi SR (2005) Conspecific sperm precedence in two species of tropical sea urchins. *Evolution* **59**, 97-105.
- Goldstien SJ, Dupont L, Viard F, *et al.* (2011) Global phylogeography of the widely introduced North West Pacific ascidian *Styela clava*. *Plos One* **6**, e16755.
- Gompert Z, Lucas LK, Buerkle CA, *et al.* (2014) Admixture and the organization of genetic diversity in a butterfly species complex revealed through common and rare genetic variants. *Molecular Ecology* **23**, 4555-4573.
- Grosholz E (2002) Ecological and evolutionary consequences of coastal invasions. *Trends in Ecology & Evolution* **17**, 22-27.
- Grower JC (1966) Some distance properties of latent root and vector methods used in multivariate analysis. *Biometrika* **53**, 325-338.
- Guisan A, Petitpierre B, Broennimann O, Daehler C, Kueffer C (2014) Unifying niche shift studies: insights from biological invasions. *Trends in Ecology & Evolution* **29**, 260-269.
- Guo Q (2014) Plant hybridization: the role of human disturbance and biological invasion. *Diversity and Distributions* **20**, 1345-1354.
- Guo Z, Liu J, Lek S, *et al.* (2012) Habitat segregation between two congeneric and introduced goby species. *Fundamental and Applied Limnology* **181**, 241-251.

-H-

- Harada Y, Takagaki Y, Sunagawa M, *et al.* (2008) Mechanism of self-sterility in a hermaphroditic chordate. *Science* **320**, 548-550.
- Hardin G (1960) Competitive exclusion principle *Science* **131**, 1292-1297.
- Harrison RG (2012) The language of Speciation. *Evolution* **66**, 3643-3657.
- Harrison RG, Larson EL (2014) Hybridization, introgression, and the nature of species boundaries. *Journal of Heredity* **105**, 795-809.
- Haydar D (2012) What is natural? The scale of cryptogenesis in the North Atlantic Ocean. *Diversity and Distributions* **18**, 101-110.
- Haydar D, Hoarau G, Olsen JL, Stam WT, Wolff WJ (2011) Introduced or glacial relict? Phylogeography of the cryptogenic tunicate *Molgula manhattensis* (Asciacea, Pleurogona). *Diversity and Distributions* **17**, 68-80.
- Hedrick PW (2013) Adaptive introgression in animals: examples and comparison to new mutation and standing variation as sources of adaptive variation. *Molecular Ecology* **22**, 4606-4618.

- Hegde SG, Nason JD, Clegg JM, Ellstrand NC (2006) The evolution of California's wild radish has resulted in the extinction of its progenitors. *Evolution* **60**, 1187-1197.
- Heredia SM, Ellstrand NC (2014) Novel seed protection in the recently evolved invasive, California wild radish, a hybrid *Raphanus* sp. (Brassicaceae) *American Journal of Botany* **101**, 2043-2051.
- Hewitt C, Martin R (2001) Revised protocols for baseline surveys for introduced marine species- survey design, sampling protocols and specimen handling. Technical Report pp.46. *Centre for Research on Introduced Marine Pests, Hobart* (Australia)
- Hewitt CL, Campbell ML, Thresher RE, *et al.* (2004) Introduced and cryptogenic species in Port Phillip Bay, Victoria, Australia. *Marine Biology* **144**, 183-202.
- Hewitt GM (1988) Hybrid zones : Natural laboratories for evolutionary studies. *Trends in Ecology & Evolution* **3**, 158-167.
- Hewitt GM (2000) The genetic legacy of the Quaternary ice ages. *Nature* **405**, 907-913.
- Hewitt GM (2004) Genetic consequences of climatic oscillations in the Quaternary. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* **359**, 183-195.
- Hewitt GM (2011) Quaternary phylogeography: the roots of hybrid zones. *Genetica* **139**, 617-638.
- Hoarau G, Coyer JA, Veldsink JH, Stam WT, Olsen JL (2007) Glacial refugia and recolonization pathways in the brown seaweed *Fucus serratus*. *Molecular Ecology* **16**, 3606-3616.
- Hoarau G, Coyer JA, Giesbers MCWG, Jueterbock A, Olsen JL (2015) Pre-zygotic isolation in the macroalgal genus *Fucus* from four contact zones spanning 100-10000 years: a tale of reinforcement? *Royal Society open science* **2**, 140538-140538.
- Hohenlohe PA, Day MD, Amish SJ, *et al.* (2013) Genomic patterns of introgression in rainbow and westslope cutthroat trout illuminated by overlapping paired-end RAD sequencing. *Molecular Ecology* **22**, 3002-3013.
- Hoshino ZT, Tokioka T (1967) An unusually robust *Ciona* from the northeastern coast of Honsyu Island, Japan. *Publications of the Seto Marine Biological laboratory* **15**, 275-290.
- Hovick SM, Campbell LG, Snow AA, Whitney KD (2012) Hybridization alters early life-history traits and increases plant colonization success in a novel region. *American Naturalist* **179**, 192-203.
- Hubbell SP (2001) *The unified neutral theory of biodiversity and biogeography* Princeton University Press, USA.
- Huvet A, Gerard A, Ledu C, *et al.* (2002) Is fertility of hybrids enough to conclude that the two oysters *Crassostrea gigas* and *Crassostrea angulata* are the same species? *Aquatic Living Resources* **15**, 45-52.
- Huvet A, Fabioux C, McCombie H, Lapegue S, Boudry P (2004) Natural hybridization between genetically differentiated populations of *Crassostrea gigas* and *C. angulata* highlighted by sequence variation in flanking regions of a microsatellite locus. *Marine Ecology Progress Series* **272**, 141-152.

-I-

- Iannelli F, Pesole G, Sordino P, Gissi C (2007) Mitogenomics reveals two cryptic species in *Ciona intestinalis*. *Trends in Genetics* **23**, 419-422.

-J-

- Jofre Madariaga D, Rivadeneira MM, Tala F, Thiel M (2014) Environmental tolerance of the two invasive species *Ciona intestinalis* and *Codium fragile*: their invasion potential along a temperate coast. *Biological Invasions* **16**, 2507-2527.
- Johnson MTJ, Stinchcombe JR (2007) An emerging synthesis between community ecology and evolutionary biology. *Trends in Ecology & Evolution* **22**, 250-257.

-K-

- Keane RM, Crawley MJ (2002) Exotic plant invasions and the enemy release hypothesis. *Trends in Ecology & Evolution* **17**, 164-170.
- Kim KS, Ratcliffe ST, French BW, Liu L, Sappington TW (2008) Utility of EST-Derived SSRs as population genetics markers in a beetle. *Journal of Heredity* **99**, 112-124.
- Kirkpatrick M, Ravigne V (2002) Speciation by natural and sexual selection: Models and experiments. *American Naturalist* **159**, S22-S35.

- Kocak F, Ergen Z, Cinar ME (1999) Fouling organisms and their developments in a polluted and an unpolluted marina in the Aegean Sea (Turkey). *Ophelia* **50**, 1-20.
- Koechlin N (1977) Installation d'un épifaune a *Spirographis spallanzani* Viviani, *Sycon ciliatum* Fabricius et *Ciona intestinalis* (L.) dans le port de plaisance de Lézardrieux (Côtes du Nord). *Cahiers de Biologie Marine* **18**, 325-337
- Kolar CS, Lodge DM (2001) Progress in invasion biology: predicting invaders. *Trends in Ecology & Evolution* **16**, 199-204.
- Krosby M, Wilsey CB, McGuire JL, *et al.* (2015) Climate-induced range overlap among closely related species. *Nature Climate Change* **5**, 883-886.

-L-

- Lambert C, Lafargue F, Lambert G (1990) Preliminary note on the genetic isolation of *Ciona* species (Asciacea, Urochordata). *Vie et Milieu* **40**, 293-295.
- Lambert CC, Lambert G (1998) Non-indigenous ascidians in southern California harbors and marinas. *Marine Biology* **130**, 675-688.
- Lambert CC, Lambert G (2003) Persistence and differential distribution of nonindigenous ascidians in harbors of the Southern California Bight. *Marine Ecology Progress Series* **259**, 145-161.
- Lambert G (2004) The south temperate and antarctic ascidian *Corella eumyota* reported in two harbors in northwestern France. *Journal of the Marine Biological Association of UK* **84**, 239-241.
- Lambert G (2005) Ecology and natural history of the protochordates. *Canadian Journal of Zoology-Revue Canadienne De Zoologie* **83**, 34-50.
- Lambert G (2009) Adventures of a sea squirt sleuth: unraveling the identity of *Didemnum vexillum*, a global ascidian invader. *Aquatic Invasions* **4**, 5-28.
- Larson EL, Andres JA, Bogdanowicz SM, Harrison RG (2013) Differential introgression in a mosaic hybrid zone reveals candidate barrier genes *Evolution* **67**, 3653-3661.
- Larson EL, White TA, Ross CL, Harrison RG (2014) Gene flow and the maintenance of species boundaries. *Molecular Ecology* **23**, 1668-1678.
- Lejeusne C, Bock DG, Theriault TW, MacIsaac HJ, Cristescu ME (2011) Comparative phylogeography of two colonial ascidians reveals contrasting invasion histories in North America. *Biological Invasions* **13**, 635-650.
- Lejeusne C, Latchere O, Petit N, Rico C, Green AJ (2014) Do invaders always perform better? Comparing the response of native and invasive shrimps to temperature and salinity gradients in southwest Spain. *Estuarine Coastal and Shelf Science* **136**, 102-111.
- Lenz M, da Gama BAP, Gerner NV, *et al.* (2011) Non-native marine invertebrates are more tolerant towards environmental stress than taxonomically related native species: Results from a globally replicated study. *Environmental Research* **111**, 943-952.
- Levine JM, HilleRisLambers J (2009) The importance of niches for the maintenance of species diversity. *Nature* **461**, 254-257.
- Lindeyer F, Gittenberger A (2011) Ascidians in the succession of marine fouling communities. *Aquatic Invasions* **6**, 421-434.
- Locke A (2009) A screening procedure for potential tunicate invaders of Atlantic Canada. *Aquatic Invasions* **4**, 71-79.
- Lockwood JL, Cassey P, Blackburn T (2005) The role of propagule pressure in explaining species invasions. *Trends in Ecology & Evolution* **20**, 223-228.
- Lodge DM (1993) Biological invasions : Lessons for ecology. *Trends in Ecology & Evolution* **8**, 133-137.
- Lopez-Legentil S, Legentil ML, Erwin PM, Turon X (2015) Harbor networks as introduction gateways: contrasting distribution patterns of native and introduced ascidians. *Biological Invasions* **17**, 1623-1638.
- Lundalv T, Christie H (1986) Comparative trends and ecological patterns of rocky subtidal communities in the swedish and norwegian Skagerrak area. *Hydrobiologia* **142**, 71-80.
- Luttkhuizen PC, Drent J, Peijnenburg, KTCA, van der Veer, HW, Johannesson, K (2012) Genetic architecture in a marine hybrid zone: comparing outlier detection and genomic clines analysis in the bivalve *Macoma balthica*. *Molecular Biology* **21**, 3048-3061.

-M-

- Mackenzie AB (2011) Biological synopsis of the European sea squirt *Ascidella aspersa*. *Canadian Manuscript Report of Fisheries and Aquatic Sciences* **2968**.

- Maddison WP (1997) Gene trees in species trees. *Systematic Biology* **46**, 523-536.
- Maggs CA, Castilho R, Foltz D, *et al.* (2008) Evaluating signatures of glacial refugia for North Atlantic benthic marine taxa. *Ecology* **89**, S108-S122.
- Martin NH, Bouck AC, Arnold ML (2006) Detecting adaptive trait introgression between *Iris fulva* and *I. brevicaulis* in highly selective field conditions. *Genetics* **172**, 2481-2489.
- Mayr E (1963) *Animal species and evolution*. The Belknap Press of Harvard University press, Cambridge (MA).
- Metzker ML (2010) Applications of next generation sequencing: Sequencing technologies - the next generation. *Nature Reviews Genetics* **11**, 31-46.
- Millar RH (1952) The annual growth and reproductive cycle in four ascidians. *Journal of Marine Biological Association of United Kingdom* **31**, 41-61.
- Millar RH (1953) *Ciona*. In: LMBC Memoirs of typical British marine plants and animals (ed. Colman JS), XXXV pp. 123. Liverpool University Press, Liverpool.
- Millar RH (1966) Tunicata. Ascidiacea. *Marine Invertebrates of Scandinavia*. Universitetsforlaget, Oslo, pp. 123.
- Mineur F, Belsher T, Johnson MP, Maggs CA, Verlaque M (2007) Experimental assessment of oyster transfers as a vector for macroalgal introductions. *Biological Conservation* **137**, 237-247.
- Mineur F, Cook EJ, Minchin D, *et al.* (2012) Changing coasts: Marine aliens and artificial structures In: *Oceanography and Marine Biology: An Annual Review*, Vol 50 (eds. Gibson RN, Atkinson RJA, Gordon JDM, Hughes RN), pp. 189-233.
- Molnar JL, Gamboa RL, Revenga C, Spalding MD (2008) Assessing the global threat of invasive species to marine biodiversity. *Frontiers in Ecology and the Environment* **6**, 485-492.
- Moniot C, Moniot F (1985) Apparition de l'ascidies *Perophora japonica* sur les côtes et dans les ports de la Manche. *Compte rendu de la société de biogéographie* **61**, 111-116.
- Morgan TH (1904) Self-fertilization induced by artificial means. *Journal of Experimental Zoology* **1**, 135-178.
- Muhlfeld CC, Kovach RP, Jones LA, *et al.* (2014) Invasive hybridization in a threatened species is accelerated by climate change. *Nature Climate Change* **4**, 620-624.
- Muller HJ (1942) Isolation mechanisms, evolution and temperature. *Biological Symposium* **106**, 71-125.
- Murray CC, Pakhomov EA, Theriault TW (2011) Recreational boating: a large unregulated vector transporting marine invasive species. *Diversity and Distributions* **17**, 1161-1172.

-N-

- Nadeau N (2014) Butterfly genomics sheds light on the process of hybrid speciation. *Molecular Ecology* **23**, 4441-4443.
- Nielsen EE, Hemmer-Hansen J, Poulsen NA, *et al.* (2009) Genomic signatures of local directional selection in a high gene flow marine organism; the Atlantic cod (*Gadus morhua*). *Bmc Evolutionary Biology* **9**, 276
- Nilsson NA (1967) Interactive segregation between fish species. In: *The biological basis of freshwater fish production* (ed. Gerking SD), pp. 295-313. Blackwell.
- Nunes AL, Katsanevakis S, Zenetos A, Cardoso AC (2014) Gateways to alien invasions in the European seas. *Aquatic Invasions* **9**, 133-144.
- Nydam ML, Harrison RG (2007) Genealogical relationships within and among shallow-water *Ciona* species (Ascidiacea). *Marine Biology* **151**, 1839-1847.
- Nydam M, Stachowicz JJ (2007) Predator effects on fouling community development. *Marine Ecology Progress Series* **337**, 93-101.
- Nydam ML, Harrison RG (2010) Polymorphism and divergence within the ascidian genus *Ciona*. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **56**, 718-726.
- Nydam ML, Harrison RG (2011) Introgression despite substantial divergence in a broadcast spawning marine invertebrate. *Evolution* **65**, 429-442.

-O-

- Olden JD, Poff NL, Douglas MR, Douglas ME, Fausch KD (2004) Ecological and evolutionary consequences of biotic homogenization. *Trends in Ecology & Evolution* **19**, 18-24.
- Orr MR, Smith TB (1998) Ecology and speciation. *Trends in Ecology and Evolution* **13**, 502-506.

- Orr HA (1995) The population genetics of speciation: the evolution of hybrid incompatibilities. *Genetics* **139**, 1805-1813.
- Ordóñez V, Pascual M, Rius M, Turon X (2013) Mixed but not admixed: a spatial analysis of genetic variation of an invasive ascidian on natural and artificial substrates. *Marine Biology* **160**, 1645-1660.
- Ordóñez V, Pascual M, Fernández-Tejedor M, et al. (2015) Ongoing expansion of the worldwide invader *Didemnum vexillum* (Ascidacea) in the Mediterranean Sea: high plasticity of its biological cycle promotes establishment in warm waters. *Biological Invasions* **17**, 2075-2085.
- Ostbye K, Amundsen PA, Bernatchez L, et al. (2006) Parallel evolution of ecomorphological traits in the European whitefish *Coregonus lavaretus* (L.) species complex during postglacial times. *Molecular Ecology* **15**, 3983-4001.

-P-

- Palumbi SR (1994) Genetic divergence, reproductive isolation and marine speciation. *Annual Review of Ecology and Systematics* **25**, 547-572.
- Pancucci-Papadopoulou MA, Raitsos DE, Corsini-Foka M (2012) Biological invasions and climatic warming: implications for south-eastern Aegean ecosystem functioning. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* **92**, 777-789.
- Pante E, Puillandre N, Viricel A, et al. (2015a) Species are hypotheses: avoid connectivity assessments based on pillars of sand. *Molecular Ecology* **24**, 525-544.
- Pante E, Abdelkrim J, Viricel A, et al. (2015b) Use of RAD sequencing for delimiting species. *Heredity* **114**, 450-459.
- Parmesan C (2006) Ecological and evolutionary responses to recent climate change. *Annual Review of Ecology and Systematics* **37**, 637-669.
- Parravicini V, Azzurro E, Kulbicki M, Belmaker J (2015) Niche shift can impair the ability to predict invasion risk in the marine realm: an illustration using Mediterranean fish invaders. *Ecology Letters* **18**, 246-253.
- Patarnello T, Volckaert FAMJ, Castilho R (2007) Pillars of Hercules: is the Atlantic-Mediterranean transition a phylogeographical break? *Molecular Ecology* **16**, 4426-4444.
- Pechenik JA, Lima GM (1984) Relationship between growth, differentiation and length of larval life for individually reared larvae of the marine gastropod, *Crepidula fornicata*. *Biological Bulletin* **166**, 537-549.
- Pennati R, Ficetola GF, Brunetti R, et al. (2015) Morphological differences between larvae of the *Ciona intestinalis* species complex: Hints for a valid taxonomic definition of distinct species. *Plos One* **10**, e0122879.
- Perelman P, Johnson WE, Roos C, et al. (2011) A molecular phylogeny of living primates. *Plos Genetics* **7**, e1001342.
- Perez-Portela R, Turon X, Bishop JDD (2012) Bottlenecks and loss of genetic diversity: spatio-temporal patterns of genetic structure in an ascidian recently introduced in Europe. *Marine Ecology-Progress Series* **451**, 93-105.
- Perez-Portela R, Arranz V, Rius M, Turon X (2013) Cryptic speciation or global spread? The case of a cosmopolitan marine invertebrate with limited dispersal capabilities. *Scientific Reports* **3**, 3197.
- Petersen JK, Riisgard HU (1992) Filtration capacity of the ascidian *Ciona intestinalis* and its grazing impact in a shallow fjord. *Marine Ecology Progress Series* **88**, 9-17.
- Petersen JK, Svane I (1995) Laval dispersal in the ascidian *Ciona intestinalis* (L.): Evidence for a closed population. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* **186**, 89-102.
- Petersen JK, Schou O, Thor P (1997) In situ growth of the ascidian *Ciona intestinalis* (L.) and the blue mussel *Mytilus edulis* in an eelgrass meadow. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* **218**, 1-11.
- Pranovi F, Franceschini G, Casale M, et al. (2006) An ecological imbalance induced by a non-native species: The Manila clam in the Venice Lagoon. *Biological Invasions* **8**, 595-609.
- Procaccini G, Affinito O, Toscano F, Sordino P (2011) A new animal model for merging ecology and evolution. In: *Evolutionary biology: concepts, biodiversity, macroevolution and genome evolution* (ed. Pontarotti G), pp. 91-106, Springer Verlag, Berlin.

-R-

- Racimo F, Sankararaman S, Nielsen R, Huerta-Sanchez E (2015) Evidence for archaic adaptive introgression in humans. *Nature Reviews Genetics* **16**, 359-371.
- Ramsay A, Davidson J, Landry T, Arsenault G (2008) Process of invasiveness among exotic tunicates in Prince Edward Island, Canada. *Biological Invasions* **10**, 1311-1316.

- Ramsay A, Davidson J, Bourque D, Stryhn H (2009) Recruitment patterns and populations development of the invasive ascidian *Ciona intestinalis* in Prince Edward Island, Canada. *Aquatic Invasions* **4**, 169-176.
- Ravigné V, Barberousse A, Bierne N, et al. (2010) La spéciation. In: *Biologie Evolutive* (eds. Thomas F, Lefèvre T, Raymond M). De Boeck, Bruxelles.
- Rhymer JM, Simberloff D (1996) Extinction by hybridization and introgression. *Annual Review of Ecology and Systematics* **27**, 83-109.
- Richards CL, Bossdorf O, Muth NZ, Gurevitch J, Pigliucci M (2006) Jack of all trades, master of some? On the role of phenotypic plasticity in plant invasions. *Ecology Letters* **9**, 981-993.
- Rigal F (2009) Dynamique spatio-temporelle du nuage larvaire du gastéropode introduit *Crepidula fornicata* au sein d'une baie mégatidale, la baie de Morlaix (France). *PhD thesis*. Université Pierre et Marie Curie, Paris.
- Riquet F, Daguin-Thiebaut C, Ballenghien M, Bierne N, Viard F (2013) Contrasting patterns of genome-wide polymorphism in the native and invasive range of the marine mollusc *Crepidula fornicata*. *Molecular Ecology* **22**, 1003-1018.
- Rius M, Turon X, Marshall DJ (2009) Non-lethal effects of an invasive species in the marine environment: the importance of early life-history stages. *Oecologia* **159**, 873-882.
- Rius M, Branch GM, Griffiths CL, Turon X (2010) Larval settlement behaviour in six gregarious ascidians in relation to adult distribution. *Marine Ecology Progress Series* **418**, 151-163.
- Rius M, Heasman KG, McQuaid CD (2011) Long-term coexistence of non-indigenous species in aquaculture facilities. *Marine Pollution Bulletin* **62**, 2395-2403.
- Rius M, Darling JA (2014) How important is intraspecific genetic admixture to the success of colonising populations? *Trends in Ecology & Evolution* **29**, 233-242.
- Rius M, Clusella-Trullas S, McQuaid CD, et al. (2014a) Range expansions across ecoregions: interactions of climate change, physiology and genetic diversity. *Global Ecology and Biogeography* **23**, 76-88.
- Rius M, Potter EE, Aguirre JD, Stachowicz JJ (2014b) Mechanisms of biotic resistance across complex life cycles. *Journal of Animal Ecology* **83**, 296-305.
- Rius M, Turon X, Bernardi G, Volckaert FAM, Viard F (2015) Marine invasion genetics: from spatio-temporal patterns to evolutionary outcomes. *Biological Invasions* **17**, 869-885.
- Robuchon M (2014) Etude spatio-temporelle de la biodiversité des forêts de laminaires des côtes bretonnes par une approche intégrée de génétique des populations et d'écologie des communautés, *PhD thesis*. MNHN.
- Roman J (2006) Diluting the founder effect: cryptic invasions expand a marine invader's range. *Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences* **273**, 2453-2459.
- Roman J, Darling JA (2007) Paradox lost: genetic diversity and the success of aquatic invasions. *Trends in Ecology & Evolution* **22**, 454-464.
- Rosindell J, Hubbell SP, Etienne RS (2011) The unified neutral theory of biodiversity and biogeography at age ten. *Trends in Ecology & Evolution* **26**, 340-348.
- Roux C, Tsagkogeorga G, Bierne N, Galtier N (2013) Crossing the species barrier: Genomic hotspots of introgression between two highly divergent *Ciona intestinalis* species. *Molecular Biology and Evolution* **30**, 1574-1587.
- Roux C, Fraisse C, Castric V, et al. (2014) Can we continue to neglect genomic variation in introgression rates when inferring the history of speciation? A case study in a *Mytilus* hybrid zone. *Journal of Evolutionary Biology* **27**, 1662-1675.
- Ryland JS, De Blauwe H, Lord R, Mackie JA (2009) Recent discoveries of alien *Watersipora* (Bryozoa) in Western Europe, with redescrptions of species. *Zootaxa*, 43-59.
- Ryland JS, Bishop JDD, De Blauwe H, et al. (2011) Alien species of *Bugula* (Bryozoa) along the Atlantic coasts of Europe. *Aquatic Invasions* **6**, 17-31.

-S-

- Saarman NP, Pogson GH (2015) Introgression invasive and native blue mussels (genus *Mytilus*) in the central California hybrid zone. *Molecular Ecology* **24**, 4723-4738.
- Sabour B, Reani A, El Magouri H, Haroun R (2013) *Sargassum muticum* (Yendo) Fensholt (Fucales, Phaeophyta) in Morocco, an invasive marine species new to the Atlantic coast of Africa. *Aquatic Invasions* **8**, 97-102.
- Sakai AK, Allendorf FW, Holt JS, et al. (2001) The population biology of invasive species. *Annual Review of Ecology and Systematics* **32**, 305-332.
- Salmon A, Ainouche ML, Wendel JF (2005) Genetic and epigenetic consequences of recent hybridization and polyploidy in *Spartina* (Poaceae). *Molecular Ecology* **14**, 1163-1175.

- Sato A, Satoh N, Bishop JDD (2012) Field identification of 'types' A and B of the ascidian *Ciona intestinalis* in a region of sympatry. *Marine Biology* **159**, 1611-1619.
- Sato A, Shimeld SM, Bishop JDD (2014) Symmetrical reproductive compatibility of the two species in the *Ciona intestinalis* (Acidiacea) species complex, a model for marine genomics and developmental biology. *Zoological Science* **31**, 369-374.
- Satoh N, Rokhsar D, Nishikawa T (2014) Chordate evolution and the three-phylum system. *Proceedings of the Royal Society B- Biological Sciences*, doi: 10.1098/rspb.2014.1729
- Saul W-C, Jeschke JM (2015) Eco-evolutionary experience in novel species interactions. *Ecology Letters* **18**, 236-245.
- Sax DF, Brown JH (2000) The paradox of invasion. *Global Ecology and Biogeography* **9**, 363-371.
- Schierenbeck KA, Ellstrand NC (2009) Hybridization and the evolution of invasiveness in plants and other organisms. *Biological Invasions* **11**, 1093-1105.
- Schluter D (2001) Ecology and the origin of species. *Trends in Ecology & Evolution* **16**, 372-380.
- Schonbeck M, Norton TA (1978) Factors controlling the upper limits of furoid algae on the shore. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* **31**, 303-313.
- Schonbeck M, Norton TA (1980) Factors controlling the lower limits of furoid algae on the shore. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* **43**, 131-150.
- Servedio MR, Noor MAF (2003) The role of reinforcement in speciation: Theory and data. *Annual Review of Ecology Evolution and Systematics* **34**, 339-364.
- Shanks AL, Grantham BA, Carr MH (2003) Propagule dispersal distance and the size and spacing of marine reserves. *Ecological Applications* **13**, 159-169.
- Shanks AL (2009) Pelagic larval duration and dispersal distance revisited. *Biological Bulletin* **216**, 373-385.
- Shenkar N, Swalla BJ (2011) Global diversity of Ascidiacea. *Plos One* **6**, e20657.
- Shenkar N, Sanamyan K (2015a) *Ciona intestinalis* (Linnaeus, 1767). In: Shenkar, N.; Gittenberger, A.; Lambert, G.; Rius, M.; Moreira Da Rocha, R.; Swalla, B.J.; Turon, X. (2015) *Ascidiacea World Database*. Accessed through: World Register of Marine Species at <http://www.marinespecies.org/aphia.php?p=taxdetails&id=103732> on 2015-10-06.
- Shenkar N, Sanamyan K (2015b) *Ciona robusta* Hoshino & Tokioka, 1967. In: Shenkar, N.; Gittenberger, A.; Lambert, G.; Rius, M.; Moreira Da Rocha, R.; Swalla, B.J.; Turon, X. (2015) *Ascidiacea World Database*. Accessed through: World Register of Marine Species at <http://www.marinespecies.org/aphia.php?p=taxdetails&id=252565> on 2015-10-06.
- Silva PC, Woodfield RA, Cohen AN, Harris LH, Goddard JHR (2002) First report of the Asian kelp *Undaria pinnatifida* in the northeastern Pacific Ocean. *Biological Invasions* **4**, 333-338.
- Simberloff D (2009) The role of propagule pressure in biological invasions. *Annual Review of Ecology Evolution and Systematics* **40**, 81-102.
- Simkanin C, Davidson IC, Dower JF, Jamieson G, Therriault TW (2012) Anthropogenic structures and the infiltration of natural benthos by invasive ascidians. *Marine Ecology-an Evolutionary Perspective* **33**, 499-511.
- Simmen MW, Leitgeb S, Charlton J, et al. (1999) Nonmethylated transposable elements and methylated genes in a chordate genome. *Science* **283**, 1164-1167.
- Simoncini M, Miller RJ (2007) Feeding preference of *Strongylocentrotus droebachiensis* (Echinoidea) for a dominant native ascidian, *Aplidium glabrum*, relative to the invasive ascidian *Botrylloides violaceus*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* **342**, 93-98.
- Smadja C, Catalan J, Ganem G (2004) Strong premating divergence in a unimodal hybrid zone between two subspecies of the house mouse. *Journal of Evolutionary Biology* **17**, 165-176.
- Stachowicz JJ, Terwin JR, Whitlatch RB, Osman RW (2002) Linking climate change and biological invasions: Ocean warming facilitates nonindigenous species invasions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **99**, 15497-15500.
- Struebig MJ, Kingston T, Petit EJ, et al. (2011) Parallel declines in species and genetic diversity in tropical forest fragments. *Ecology Letters* **14**, 582-590.
- Suchanek TH, Geller JB, Kreiser BR, Mitton JB (1997) Zoogeographic distributions of the sibling species *Mytilus galloprovincialis* and *M. trossulus* (Bivalvia: Mytilidae) and their hybrids in the north Pacific. *Biological Bulletin* **193**, 187-194.
- Suzuki MM, Nishikawa T, Bird A (2005) Genomic approaches reveal unexpected genetic divergence within *Ciona intestinalis*. *Journal of Molecular Evolution* **61**, 627-635.
- Svane I, Havenhand JN (1993) Spawning and dispersal in *Ciona intestinalis* (L.). *Marine Ecology* **14**, 53-66.

-T-

- Tine M, Kuhl H, Gagnaire P-A, et al. (2014) European sea bass genome and its variation provide insights into adaptation to euryhalinity and speciation. *Nature Communications* **5**.
- Tracy BM, Reynolds NB (2014) Spatial and temporal patterns of native and invasive ascidian assemblages in a Southern California embayment. *Aquatic Invasions* **9**, 441-455.
- Turner TL, Hahn MW, Nuzhdin SV (2005) Genomic islands of speciation in *Anopheles gambiae*. *Plos Biology* **3**, 1572-1578.

-U-

- Urban MC, Leibold MA, Amarasekare P, et al. (2008) The evolutionary ecology of metacommunities. *Trends in Ecology & Evolution* **23**, 311-317.

-V-

- Vercaemer B, Sephton D, Nicolas JM, Howes S, Keays J (2011) *Ciona intestinalis* environmental control points: field and laboratory investigations. *Aquatic Invasions* **6**, 477-490.
- Vellend M (2003) Island biogeography of genes and species. *American Naturalist* **162**, 358-365.
- Vellend M (2005) Species diversity and genetic diversity: Parallel processes and correlated patterns. *American Naturalist* **166**, 199-215.
- Vermeij GJ (1991) Anatomy of an invasion: the trans-Artic exchange *Paleobiology* **17**, 281-307.
- Vermeij GJ (1996) An agenda for invasion biology. *Biological Conservation* **78**, 3-9.
- Vermeij GJ (2005) From Europe to America: Pliocene to recent trans-Atlantic expansion of cold-water North Atlantic molluscs. *Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences* **272**, 2545-2550.
- Vieira LM, Jones MS, Taylor PD (2014) The identity of the invasive fouling bryozoan *Watersipora subtorquata* (d'Orbigny) and some other congeneric species. *Zootaxa* **3857**, 151-182.

-W-

- Waltari E, Hijmans RJ, Peterson AT, et al. (2007) Locating Pleistocene refugia: Comparing phylogeographic and ecological niche model predictions. *Plos One* **2**, e563
- Wasson K, Zabin CJ, Bedinger L, Diaz MC, Pearse JS (2001) Biological invasions of estuaries without international shipping: the importance of intraregional transport. *Biological Conservation* **102**, 143-153.
- Whitney KD, Randell RA, Rieseberg LH (2010) Adaptive introgression of abiotic tolerance traits in the sunflower *Helianthus annuus*. *New Phytologist* **187**, 230-239.
- Whittaker RH (1960) Vegetation of the Siskiyou mountains, Oregon and California. *Ecological Monographs* **30**, 279-338.
- Wiley A (1892) Observation on the post-embryonic development of *Ciona intestinalis* and *Clavelina lepadiformis*. *Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences* **51**, 513-520.
- Williamson M, Fitter A (1996) The varying success of invaders. *Ecology* **77**, 1661-1666.
- Wilson JRU, Dormontt EE, Prentis PJ, Lowe AJ, Richardson DM (2009) Something in the way you move: dispersal pathways affect invasion success. *Trends in Ecology & Evolution* **24**, 136-144.
- Wood TE, Burke JM, Rieseberg LH (2005) Parallel genotypic adaptation: when evolution repeats itself. *Genetica* **123**, 157-170.

-Y-

- Yamaguchi M (1975) Growth and reproductive cycles of marine fouling ascidians *Ciona intestinalis*, *Styela plicata*, *Botrylloides violaceus* and *Leptoclinum mitsukurii* at Aburatsubo Moroiso inlet (Central Japan). *Marine Biology* **29**, 253-259.

-Z-

- Zenetos A, Gofas S, Morri C, *et al.* (2012) Alien species in the Mediterranean Sea by 2012. A contribution to the application of European Union's Marine Strategy Framework Directive (MSFD). Part 2. Introduction trends and pathways. *Mediterranean Marine Science* **13**, 328-352.
- Zerebecki RA, Sorte CJB (2011) Temperature tolerance and stress proteins as mechanisms of invasive species success. *Plos One* **6**, e14806.
- Zhan A, Macisaac HJ, Cristescu ME (2010) Invasion genetics of the *Ciona intestinalis* species complex: from regional endemism to global homogeneity. *Molecular Ecology* **19**, 4678-4694.
- Zhan A, Darling JA, Bock DG, Lacoursière-Roussel A, Macisaac HJ, Cristescu ME (2012) Complex genetic patterns in closely related colonizing invasive species. *Ecology and Evolution* **2**, 1331-1346.

- Glossaire -

Allopatrie : on parle d'espèces en allopatrie lorsque ces dernières occupent des aires géographiques distinctes non chevauchantes.

Balayages ou « scans » génomiques : méthodes d'analyse statistique qui permettent de mettre en évidence des régions du génome montrant des signatures de sélection, généralement indirecte ; ces méthodes identifient des locus montrant des valeurs de F_{ST} atypiques, i.e. non attendues sous hypothèse de neutralité, entre des populations structurées. Ces méthodes sont souvent utilisées pour identifier des locus impliqués dans des processus d'adaptation locale mais des locus impliqués dans des incompatibilités génétiques montrent les mêmes signatures. De ce fait, cette méthode ne permet pas de faire la distinction entre les deux processus (Biernie et al. 2011).

Biogéographie : discipline étudiant la distribution géographique des espèces et les processus à l'origine de cette distribution.

Dérive génétique : modification aléatoire des fréquences alléliques dans une population de taille finie. L'importance de la dérive génétique est d'autant plus importante que la taille efficace est petite.

Effet de fondation : effet de la dérive génétique au sein d'un petit groupe d'individus fondateurs, à l'origine d'une nouvelle population. Il se traduit notamment par une diminution de la diversité génétique par rapport à celle de la population « source » des individus fondateurs de la nouvelle population.

Espèce cryptique : se dit d'une espèce qui n'est pas différenciable morphologiquement d'une autre espèce.

Espèce cryptogénique : espèce dont le statut indigène ou non-indigène n'est pas déterminé.

Espèce introduite : cf. espèce non-indigène

Espèce invasive : espèce non-indigène dont l'aire géographique est en expansion rapide et/ou qui a un impact important sur la diversité et le fonctionnement des écosystèmes

Espèce non-indigène (syn. espèce introduite) : espèce qui a été transportée par l'homme en dehors de son aire de distribution naturelle et qui s'y reproduit en absence d'intervention humaine.

Exon : fragment codant de la séquence ADN d'un gène et qui sera transcrit ; un exon code souvent pour un domaine fonctionnel d'une protéine.

Haplotype : variants génétiques d'un même locus haploïde (équivalents des allèles à un locus diploïde)

Goulot d'étranglement (ou « bottleneck » en anglais) : réduction importante de l'effectif démographique d'une population (goulot d'étranglement démographique) se traduisant par des effets de dérive génétique entraînant une perte de diversité génétique (goulot d'étranglement génétique).

Introductions biologiques (syn. Invasions biologiques) : processus au cours desquels des activités humaines transportent de façon délibérées ou accidentelles des espèces en dehors de leur aire de distribution naturelle.

Invasions biologiques : cf. introductions biologiques

Marqueurs (locus) diagnostiques d'espèces : fragment d'ADN dont les allèles sont différenciellement fixés chez l'une ou l'autre de deux espèces, et servant à leur identification.

Marqueur allozyme : marqueur utilisant une enzyme codée par différents allèles d'un même gène. Les allozymes ne présentant pas forcément la même structure, elles peuvent être discriminées les unes des autres par électrophorèse par exemple.

Niche écologique : terme défini par Hutchinson (1957) traduisant la combinaison de n facteurs environnementaux appelés hyper-volume. On distingue généralement la niche fondamentale déterminée physiologiquement pour une espèce donnée (correspondant à la totalité de l'hyper-volume) et la niche réalisée restreinte par rapport à la niche fondamentale, par exemple du fait de la présence d'espèces compétitrices.

Paléobiologie : étude de l'histoire migratoire des espèces sur la base des éléments fossiles observés dans les couches sédimentaires.

Parapatricie : on parle d'espèce en parapatricie lorsqu'elles sont isolées géographiquement sauf dans une zone de contact étroite.

Phylogéographie : en utilisant la théorie de coalescence comme cadre conceptuel, cette discipline étudie l'histoire démographique et migratoire des espèces par des approches moléculaires

Plasticité phénotypique : capacité d'un génotype donné à développer différents phénotypes en réponse à l'environnement dans lequel il se développe (avec des différences au niveau physiologique, comportemental, morphologique ou des traits d'histoire de vie). Cette plasticité peut être adaptative quand elle est associée à un gain de valeur sélective*.

Population : ensemble d'individus d'une même espèce coexistant dans un même habitat.

Pression en propagules : terme très utilisé en biologie des invasions pour définir la combinaison du nombre d'évènements d'introduction et du nombre d'individus introduits par évènement d'introduction.

Sympatricie : on parle de deux espèces en sympatricie lorsqu'elles occupent la même aire géographique.

Syntopie : deux espèces sont en syntopie lorsqu'elles sont trouvées dans la même localité et le même habitat.

Taille efficace : La taille efficace d'une population est définie comme l'effectif d'une population idéale (i.e. tous les individus ont la même chance de contribuer à la génération suivante) présentant la même évolution, notamment en termes de dérive génétique ou de consanguinité, que la population réelle.

Traits d'histoire de vie : Traits caractérisant le cycle de vie d'une espèce (ex. développement direct ou indirect, fécondation externe ou interne etc.).

Valeur sélective (ou « fitness » en anglais) : capacité d'un individu présentant un génotype donné de se reproduire. Cette valeur est définie par le nombre de descendants produit par un individu.

- Liste des tableaux -

(hors articles)

- Introduction générale -

Tableau 1.1. Tableau récapitulatif des différentes études ayant mis en évidence de la divergence génétique et génomique entre <i>C. robusta</i> (type A) et <i>C. intestinalis</i> (type B), avant et pendant ma thèse	25
---	----

- Chapitre 1 -

Tableau 1.1. Détails des sites d'étude présentés dans la figure 1.5 et des études réalisées au sein des sites.....	40
Tableau 1.2. Résultat de l'analyse testant l'effet des périodes d'établissement et des ports suivis sur la proportion d'espèces non-indigènes dans les communautés de faune sessile.....	50
Tableau 1.3. Résultats des analyses testant l'effet des périodes d'établissement et des ports sur chacun des indices de diversité calculés dans les communautés de faune sessile.....	52
Tableau 1.4. Résultat de l'analyse testant l'effet des périodes d'établissement et des ports sur l'abondance des différents taxons de la faune sessile	53
Tableau 1.5. Résultat de l'analyse testant l'effet de la date d'échantillonnage et des ports sur la proportion d'espèces non-indigènes	55
Tableau 1.6. Résultats des analyses testant l'effet de la date d'échantillonnage et des ports suivis sur chacun des indices de diversité calculés dans les peuplements d'ascidies.....	56
Tableau 1.7. Résultat de l'analyse testant l'effet de la date d'échantillonnage et des ports suivis sur l'abondance des différents taxons du peuplement d'ascidies identifiés	58
Tableau 1.8. Résultats des analyses testant l'effet de la date d'échantillonnage et des ports suivis sur l'abondance des deux espèces : <i>C. robusta</i> et <i>C. intestinalis</i>	58
Tableau 1.9. Caractéristiques biologiques des différentes espèces d'ascidies présentes dans les habitats portuaires bretons.....	61
Tableau 1.10. Durée de vie larvaire et distance de dispersion estimée chez des invertébrés marins à cycle benthopélagique . Source : Tableau 1 de l'article Shanks (2009).....	62
Tableau 1.11. Limite inférieure et supérieure de tolérances aux variations de températures d'espèces indigènes et non-indigènes prélevées dans le port de Bodega Bay en Californie. Tableau tiré de Zerebecki <i>et al.</i> (2011).....	64
Tableau 1.12. Inventaires bibliographiques des données de densités disponibles pour <i>C. robusta</i> et <i>C. intestinalis</i> dans différentes régions.....	71

- Liste des figures -

(hors articles)

- Introduction générale -

Figure I.1. Modèles de distribution d'une espèce en fonction de la densité des populations en nombre d'individus le long d'un transect géographique fictif. Figure tirée de Brown (1984).....	2
Figure I.2. Histoire de la recolonisation de l'espèce algale <i>Fucus serratus</i> en Europe depuis le dernier maximum glaciaire. Figure tirée de Hoarau <i>et al.</i> (2007).....	3
Figure I.3. Modification d'abondance de 5 espèces de poissons observées entre 1992 et 2012, en Tasmanie. Figure extraite de la Figure S5 de Bates <i>et al.</i> (2015).....	4
Figure I.4. Expansion de <i>Sargassum muticum</i> en Amérique du Nord (A) et en Europe (B), deux régions d'introduction de cette algue brune originaire d'Asie. Figure I. tirée d'Engelen <i>et al.</i> (2015).....	5
Figure I.5. Schéma et tableau catégorisant les différentes étapes du succès d'une introduction biologique selon Blackburn <i>et al.</i> (2011). Figure tirée de Blackburn <i>et al.</i> (2011).....	6
Figure I.6. Scénarios théoriques conduisant à une invasion biologique, en fonction des caractéristiques environnementales de la région d'introduction et de l'espèce au cours du temps. Figure tirée Facon <i>et al.</i> (2006).....	7
Figure I.7. Carte de distribution des espèces introduites « nuisibles » (i.e. ayant un impact sur l'écosystème ou les communautés), soit 57% des 329 espèces étudiés par Molnar <i>et al.</i> (2008) parmis les 232 écorégions marines réparties à l'échelle mondiale. Figure issue de Molnar <i>et al.</i> (2008).....	11
Figure I.8. Diversité génétique au sein de populations de l'aire de distribution naturelle et de l'aire d'introduction du mollusque <i>Crepidula fornicata</i> montrant l'absence de perte de diversité génétique entre les deux types d'aire. Figure issue de Riquet <i>et al.</i> (2013).....	12
Figure I.9. Contribution annuelle de l'espèce locale <i>Coregonus lavaretus</i> et de l'espèce introduite <i>C. albula</i> dans les communautés de poissons pélagiques d'un cours d'eau situé en Finlande (Pasvik), deux années après l'introduction de ce dernier. Figure modifiée de Bohn <i>et al.</i> (2008).....	13
Figure I.10. Propagation spatio-temporelle des allèles de la truite arc-en-ciel (<i>Oncorhynchus mykiss</i>), par hybridation et introgression, dans les populations de la truite fardée (<i>O. clarkii lewisi</i>) entre les années 1980 et 2000. Figure tirée de Muhlfeld <i>et al.</i> (2015).....	15
Figure I.11. Variations de la fréquence allélique observée dans les populations de la salamandre Californienne. Figure modifiée de Fitzpatrick <i>et al.</i> (2010).....	18
Figure I.12. Schématisation de différentes histoires évolutives conduisant à du polymorphisme partagé entre deux taxons (l'allèle ancestral est noté A1 et l'allèle dérivé A2). Figure modifiée de Hedrick (2013).....	19
Figure I.13. Représentation de la semi perméabilité des génomes de deux espèces en cours de divergence. Figure issue de Harrison & Larson (2014).....	20
Figure I.14. Principe de la boucle de la taxonomie intégrative. Figure tirée de Pante <i>et al.</i> (2015).....	23
Figure I.15. <i>Ciona robusta</i> (individu à la tunique nacrée et aux protubérances visibles sur la tunique) et <i>Ciona intestinalis</i> (individu à la tunique transparente possédant une corolle jaune autour des siphons inhalant et exhalant). © Wilfried Thomas, Station Biologique de Roscoff.....	23
Figure I.16. (A) Arbre phylogénétique construit avec la séquence mitochondriale codant pour la sous-unité 1 de la cytochrome oxydase (mtCOI) montrant la divergence génétique entre les espèces du genre <i>Ciona</i>. Arbres consensus créés à partir d'inférences bayésiennes sur la base de la séquence de deux gènes nucléaires vAChTP (B) et CiCesA (C). Figures tirées de Nydam & Harrison (2007, 2010).....	24

Figure I.17. Distribution à l'échelle mondiale de <i>Ciona robusta</i> et <i>C. intestinalis</i> sur la base des données de la littérature. Figure réalisée à partir des informations issues de Caputi <i>et al.</i> (2007), Zhan <i>et al.</i> (2010) et Procaccini <i>et al.</i> (2011).....	26
Figure I.18. Photographies représentatives de la morphologie des larves de <i>C. robusta</i> (A) et <i>C. intestinalis</i> type B (B). Figures tirées de Pennati <i>et al.</i> (2015).....	27
Figure I.19. (a) <i>Ciona intestinalis</i> type A, renommé <i>Ciona robusta</i> par Brunetti <i>et al.</i> (2015) ; cet individu a été prélevé dans la lagune de Venise. Photographies tirées de Brunetti <i>et al.</i> (2015).....	27
Figure I.20. Schéma des scénarios de spéciation testés entre <i>C. robusta</i> et <i>C. intestinalis</i> . Figure modifiée de Roux <i>et al.</i> (2013).....	28
Figure I.21. Succès de fécondation pour des croisements homospécifiques (i.e. utilisant des gamètes mâles et femelles de la même espèce, nommés AA et BB) et hétérospécifiques (i.e. utilisant des gamètes mâles et femelles d'espèce différentes, nommés AB et BA). (A) Figure issue de Suzuki <i>et al.</i> (2005), (B) Figure tirée de Caputi <i>et al.</i> (2007), (C) Figure tirée de Sato <i>et al.</i> (2014).....	30
Figure I.22. Proportion relative d'individus de <i>C. robusta</i>, <i>C. intestinalis</i> et des individus montrant des profils mixtes en 2007 et 2009. Figure tirée de Nydam & Harrison (2011).....	31
Figure I.23. Cycle de vie de l'espèce nominale <i>Ciona intestinalis</i> (Linnaeus 1767), qui a été validé en laboratoire pour les deux espèces. Les détails notés dans cette figure proviennent notamment des travaux de revue de Carver <i>et al.</i> (2006) et de Dybern (1965).....	32
Figure I.24. Photographies illustrant l'importance du « fouling », ici par <i>Ciona intestinalis</i>, sur les structures artificielles d'habitats portuaires en Bretagne: (A) sur un collecteur expérimental immergé, (B) sur un cordage pendant au ponton et (C) sur la coque d'un navire de plaisance. © Wilfried Thomas, Station Biologique de Roscoff.....	33

- Chapitre 1 -

Figure 1.1. Présence et abondance de l'ascidie non indigène <i>Asterocarpa humilis</i> dans des ports de plaisance de la Manche occidentale. Figure tirée de Bishop <i>et al.</i> (2015).....	37
Figure 1.2. Distribution de la proportion des 20 espèces introduites répertoriées par groupe taxonomique, dans les sites étudiés en Manche par Arenas <i>et al.</i> (2006).....	37
Figure 1.3. Photographie l'importance des ciones au sein des communautés d'espèces établies sous deux flotteurs adjacents au port de plaisance de Quiberon (Bretagne Sud). © Laurent Lévêque, Station Biologique de Roscoff.....	38
Figure 1.4. Distribution des espèces <i>Ciona robusta</i> et <i>Ciona intestinalis</i> le long des côtes bretonnes et atlantiques en France. Cette carte est une synthèse de points d'observations des deux espèces réalisés au cours de ces dernières années dans différents contexte.....	39
Figure 1.5. Carte des sites d'étude (i.e. ports de plaisance) dans lesquels ont été réalisés les études de la dynamique d'établissement de la faune sessile et de la caractérisation des peuplements établis d'ascidies (incluant des données de densité des populations de <i>C. robusta</i> et <i>C. intestinalis</i>).....	40
Figure 1.6. (A) Dispositif utilisé pour caractériser les communautés de faune sessile dans les habitats portuaires) adjacent à un dispositif installé depuis 6 mois sur lequel on voit une colonisation particulièrement importante par des ciones. (B) Dispositif colonisé par plusieurs espèces d'ascidies et de bryozoaires , 1 an après son installation en mars 2011 dans le port de plaisance du château. © Wilfried Thomas, Station Biologique de Roscoff.....	42
Figure 1.7. Relevé en plongée des substrats un an après leur immersion sous les pontons. Des filets en « tissu moustiquaire » sont utilisés pour empêcher la perte de spécimens au cours de leur émergence et transport. © Yan Fontana, Station Biologique de Roscoff.....	43

- Figure 1.8. **Photographie du dispositif de collecte des données : une grille composée de 100 points** (i.e. 100 intersections) **est installée sur une plaque colonisée**. Cette plaque a été collectée au port du château (Brest) en mars 2013. © John D.D. Bishop, Marine Biological Association.....43
- Figure 1.9. (A) **Stratégie de récolte utilisant des cadrats de 20 x 25 cm** répartis en quinconce le long d'un transect de 50 mètres sous un ponton. (B) **Photographie du tri réalisé à partir d'un cadrat récolté** en octobre 2014 au port de Trébeurden. © Frédérique Viard, Station Biologique de Roscoff.....47
- Figure 1.10. **Distribution des taxons par embranchement et en fonction de leur statut** indigène, non-indigène ou cryptogénique. Les taxons identifiés au niveau du genre ou de la famille n'ont pas été assignés à une catégorie mais sont également présentés dans cette figure.....50
- Figure 1.11. **Proportion du nombre d'espèces non-indigènes identifiées** dans les 6 ports dans lesquels a été réalisée l'étude de diversité des communautés de faune sessile, en fonction des trois périodes d'établissement (i.e. collecte en Mars 2012, Aout 2012, Mars 2013).....51
- Figure 1.12. **Présentation des indices de diversité utilisés pour caractériser la diversité spécifique des communautés de faune sessile** dans les 6 ports dans lesquels a été réalisée l'étude et en fonction des trois périodes d'établissement (i.e. collecte en Mars 2012, Aout 2012, Mars 2013).....52
- Figure 1.13. **Analyse en coordonnées principales (PCoA) montrant la différenciation des communautés d'espèces de faune sessile en fonction de la date (B) et des ports (C)**. Les vecteurs dans la Figure 1.A indiquent les taxons corrélés à plus de 50% à la PCO présentée (coefficient de corrélation de Pearson > 0.5). Les taxons surlignés sont considérés comme non-indigènes.....54
- Figure 1.14. **Proportion relative du nombre d'ascidies non-indigènes identifiées** dans les 9 ports dans lesquels a été réalisée l'étude des peuplements d'ascidies en Mai et Octobre 2014.....55
- Figure 1.15. **Présentation des indices de diversité utilisés pour caractériser la diversité spécifique des peuplements d'ascidies** dans les 9 ports dans lesquels a été réalisé l'étude en Mai et Octobre 2014.....56
- Figure 1.16. **Analyse des coordonnées principales (PCoA) montrant la différenciation des peuplements d'ascidies (A) en fonction de la date d'échantillonnage (B) et des ports (C)**. Les vecteurs (Figure 1.A) indiquent les taxons corrélés à plus de 50% aux axes (coefficient de corrélation de Pearson > 0.5). Les taxons surlignés sont non-indigènes.57
- Figure 1.17. **Densité moyenne des populations de *Ciona robusta* et *C. intestinalis*** par date et port. Les ports pointés d'une flèche dans les histogrammes du haut indique la présence de *C. robusta* non observable sur le graphique à cause de l'échelle de l'axe des ordonnées. Il faut d'ailleurs remarquer les différences d'échelle entre les graphiques réalisés pour *C. robusta* et *C. intestinalis*.....59
- Figure 1.18. **Distribution mondiale de la diversité haplotypique (marqueur mtCOI) des populations de l'ascidie japonaise *Styela clava***. Figure issue de Goldstein *et al.* (2011).....63
- Figure 1.19. **Moyenne mensuelle de la température** enregistrée dans tous les ports suivis, où ont été caractérisées les communautés de faune sessile (Figure 1.5) et au port de Perros Guirec uniquement. Les données de température ont été obtenues à l'aide d'enregistreur automatique (Tidbit®v2) placé sur les dispositifs entre 2011 et 2013.....64
- Figure 1.20. **Position des ports étudiés par rapport à l'embouchure des arrivées d'eau douce** (1 : St Malo, 2 : Saint Quay, 3 : Perros Guirec, 4 : Trébeurden, 5 : Roscoff, 6 : Aber Wrac'h, 7 : Moulin Blanc, 8 : Château et 9 : Camaret).....65
- Figure 1.21. **Abondance de l'espèce non-indigène *Didemnum vexillum* dans différents micro-habitats du port de Roscoff** au printemps 2013 (barres d'histogramme en gris clair) et en automne 2013 (gris foncé). L'abondance est évaluée à partir d'une échelle semi-quantitative allant de 0 à 3.....66
- Figure 1.22. **Présentation des espèces *B. diegensis* et *B. violaceus*** (Wilfried Thomas@Station Biologique de Roscoff) et de différents morphes intermédiaires non-identifiables aisément morphologiquement.....67
- Figure 1.23. **Densité moyenne (des populations de différentes espèces d'ascidies solitaires, indigènes (*C. intestinalis*, *A. aspersa*, *P. mammillata*) ou non-indigènes (*C. robusta*, *C. eumyota*)). Ces espèces étaient**

parmi les plus abondantes **en Octobre 2014**. Il faut remarquer sur ces graphiques la différence d'échelle pour l'axe des ordonnées.....70

- Chapitre 2 -

Figure 2.1. **Site d'étude de la sédentarisation des juvéniles de *C. robusta* et *C. intestinalis***.....88

Figure 2.2. (A) **Photographie des 3 plaques installées sous un ponton du port de Roscoff**, pour étudier la sédentarisation des larves d'invertébrés benthiques ©Wilfried Thomas, Station Biologique de Roscoff. (B) **Colonisation observée après un mois, sur l'une des plaques relevée en juillet 2014 dans le port du Moulin Blanc**. ©Laurent Lévêque, Station Biologique de Roscoff.....88

Figure 2.3. (A) **Variation mensuelle de la densité des juvéniles exprimée en nombre de juvéniles par dm² de *C. robusta* (points noirs) et de *C. intestinalis* (points blancs)** et (B) **abondance relative mensuelle des juvéniles de *C. robusta* (en noir) et *C. intestinalis* (en gris)**, dans les trois ports où les deux espèces sont présentes en syntopie.....89

- Chapitre 3 -

Figure 3.1. **Proportion relative de *C. robusta* (en jaune), *C. intestinalis* (en bleu) et des individus montrant des profils mixtes (i.e. possédant des allèles des deux espèces, en vert) en 2007 et 2009**. Figure tirée de Nydam & Harrison (2011) et présentée dans l'introduction générale de ce manuscrit.....118

Figure 3.2. (A) **Echantillonnage d'individus du genre *Ciona* sous un ponton en plongée au port de Quiberon**. © Laurent Lévêque, Station Biologique de Roscoff. (B) **Traitement de 40 individus post-échantillonnage** pour évaluer l'état de maturité et collecter un morceau de tissu en vue des analyses moléculaires. © Frédérique Viard, Station Biologique de Roscoff.....119

Figure 3.3. **Morphologie externe d'un individu hybride F1 âgé de 2 mois issu d'un croisement hétérospécifique entre *C. robusta* et *C. intestinalis***. Figures issues de Sato *et al.* 2012.....121

- Chapitre 4 -

Figure 4.1. **Distribution des points d'introgession le long des chromosomes du génome de *Ciona robusta***. Les locus utilisés dans l'étude de Roux *et al.* (2013) sont indiqués par des segments rouges. Les événements d'introgession de *C. intestinalis* vers *C. robusta* sont indiqués en bleu et de *C. robusta* vers *C. intestinalis* en noir. Les régions montrant un enrichissement significatif en locus introgressés sont représentées en vert (points chauds d'introgession). Figure tirée de Roux *et al.* (2013).....150

Figure 4.2. **Représentation du polymorphisme observé avec (A) 310 locus SNPs et (B) 3 marqueurs nucléaires supposés diagnostiques (génotypés par PCR-RFLP) utilisés dans différentes études de l'hybridation entre *C. intestinalis* et *C. robusta* (Nydam & Harrison 2011 ; Caputi *et al.* 2007 ; Bouchemousse *et al.* 2015), sur 449 individus provenant de populations naturelles sympatriques (no. 5-12) ou allopatriques (no. 1-4) de *C. robusta* et de *C. intestinalis***.151

Figure 4.3. **Indices hybrides (h) estimés à partir de 115 SNPs montrant un F_{ST} supérieur à 0.8 (en utilisant les populations allopatriques comme référence d'absence de flux de gènes contemporains) pour chacune des populations allopatriques (en orange) et sympatriques (en vert) de *C. robusta* et *C. intestinalis***.152

- Chapitre 5 -

Figure 5.1. **Distribution des haplotypes mitochondriaux basés sur la séquence codant pour une portion de la sous unité 3 de la cytochrome oxydase et de la sous unité 1 de la chaîne respiratoire (COX3-ND1) séquencés sur 493 individus de *C. intestinalis* (figure de droite) et 380 individus de *C. robusta* (figure de gauche) le long des côtes nord-américaines**. Figure tirée de Zhan *et al.* (2012).....192

Figure 5.2. **Distribution des haplotypes mitochondriaux** basés sur les séquences COX3-ND1 obtenues au cours de cette étude et de celle réalisée par Zhan *et al.* (2012). Ces deux études regroupent les données obtenues pour 704 individus de *C. robusta* et 1140 individus de *C. intestinalis* **de différentes régions**.....193

- Conclusion & Perspectives -

Figure C.1. **Variation saisonnière de l'abondance relative de *C. robusta* (en rouge) et de *C. intestinalis* (en bleu)** au cours de 6 générations consécutives, et sur un ensemble de ports étudiés dans le chapitre 3 (voir Bouchemousse *et al.* 2015) et **variations saisonnières de la température des eaux de surface** (présentées sous la forme de boîtes à moustache) calculées pour chacune des périodes correspondant aux générations étudiées.....227

Figure C.2. **Variation de la moyenne mensuelle** (courbe verte) **de la température des eaux de surface** enregistrée dans 7 ports bretons étudiés dans le chap.1 (étude des communautés de faune sessile). Les courbes en rouge et bleu correspondent respectivement aux seuls ports de Perros-Guirec et Roscoff.227

Figure C.3. **Conséquences écologiques et évolutives de l'homogénéisation biotique à l'échelle mondiale.** Figure tirée de Dar & Reshi (2014).....229

Figure C.4. **Classification des mécanismes reproductifs pouvant jouer sur l'hybridation entre *C. robusta* et *C. intestinalis* dans les populations syntopiques.** Figure modifiée de Ravigné *et al.* (2010).....231

Figure C.5. **Représentation schématique du modèle à deux locus (locus « A » et locus « B ») d'évolution de l'isolement post-zygotique de Dobzhansky-Muller.** Source : Ravigné *et al.* (2010).....233

Figure C.6. **Arbre phylogénétique de type Neighbor-Joining, construit à partir de 744 paires de bases de la séquence mitochondriale codant pour la sous-unité 1 de la cytochrome oxydase (mtCOI), montrant les distances génétiques entre plusieurs espèces du genre *Ciona* présentes en Manche et en Méditerranée.** Les séquences avec un nom court sont issues du laboratoire d'accueil et proviennent d'échantillons collectés par Sébastien Darras aux environs de Banyuls sur Mer, à l'exception des deux spécimens de *C. intestinalis* type D, d'origine inconnue, qui ont été collectés dans l'aquarium de Banyuls sur Mer (C. Roby, S. Darras & F. Viard, données non publiées). Les autres séquences proviennent des travaux de Nydam & Harrison (2007).....235

Figure C.7. Résultat d'une **DAPC (analyse discriminante) illustrant la faible divergence génomique entre *C. roulei* (groupe 5 en vert clair) et *C. intestinalis* (autres groupes).** Source : graphique réalisé par C. Roby.....236

Figure C.8. **Distribution mondiale et statut (indigène, non-indigène, cryptogénique) proposé pour *Ciona robusta* et *C. intestinalis*.** La distribution des espèces *C. gelatinosa* et *C. longissima* est également représentée en orange clair sur la carte de *C. intestinalis* (données issues de Dybern (1965) et Millar (1966)).....237

- Liste des encadrés -

Encadré 1. Facteurs proposés pour expliquer le paradoxe de l'invasion (illustrés par des exemples d'espèces marines non-indigènes*).....	8
Encadré 2. Les vecteurs d'introductions en milieu marin	10
Encadré 3. Isolement reproductif et spéciation : un bref aperçu sur ces processus (et une terminologie complexes)	16
Encadré 4. Adaptation locale versus barrières endogènes aux flux de gènes : un autre exemple où l'histoire des espèces compte beaucoup	21
Encadré 5. Etude de la dynamique d'établissement des communautés de faune sessile à l'échelle de la Manche Occidentale : quelques résultats préliminaires	41
Encadré 6. Présentation de différents indices utilisés pour décrire la diversité spécifique	45
Encadré 7. Description de l'analyse de variance par permutations : la PERMANOVA (Anderson 2001, Anderson <i>et al.</i> 2006).....	46
Encadré 8. Critères utilisés pour l'identification sur le terrain de <i>Ciona intestinalis</i> (<i>C. intestinalis</i> type B) et <i>C. robusta</i> (<i>C. intestinalis</i> type A) selon Sato <i>et al.</i> (2012)	48
Encadré 9. Evaluation du stade reproducteur des individus de <i>C. robusta</i> et <i>C. intestinalis</i>	120
Encadré 10. Corrélation entre diversité génétique et diversité spécifique (« <i>species genetic diversity correlation</i> », Vellend 2003).....	230

- Remerciements -

260 pages plus tard (en plus, écrit en tout petit), encore un dernier effort pour trouver les mots justes pour remercier toutes les personnes qui m'ont accompagnées et soutenues ces 3 (bon ok 4) années de thèse (heureusement que l'imprimante est longue). GROSSE GROSSE concentration pour éviter d'aligner plus 4 fautes d'orthographe par mot, de faire des phrases de plus de 5 lignes et de citer les bonnes personnes au bon moment (c'est un peu comme les refs, j'ai un peu mal).

En premier lieu, un IMMENSE MERCI à toi Fred d'avoir pris sous ton aile une petite étudiante sortant de la pampa du Nord Pas de Calais et d'un parcours dans lequel le « Fst » sonnait un peu comme un groupe de rock (ou un bar branché), dyscalculique comme c'est pas possible (17*6euuhh joker ?), et dont la blonditude peut parfois atteindre des sommets ! Blague à part, ça a été un long parcours pour arriver à obtenir cette thèse (l'ED avait flairé le poisson) mais grâce à ton soutien, ta patience et les longues heures passées à m'apprendre toutes les facettes de ce qu'est la science, j'ai réussi à réaliser ce petit rêve d'étudiante : avoir fait une thèse que j'ai adoré. Encore merci pour tout et surtout merci d'avoir cru en moi.

Evidemment je ne peux pas oublier de remercier, le superman de la taxonomie des ascidies, des bryo, hydres ... enfin bref de tout, l'unique John D.D. Bishop avec qui j'ai eu le privilège de passer 3 semaines de formation non-stop (et cela 3 fois d'affilée) à m'émerveiller (pour de vrai !) devant ces sacs à flotte que sont les ascidies. Un grand merci à toi à John pour ta patience, pour m'avoir transmis une partie de tes connaissances mais aussi d'être un co-auteur exceptionnel.

Toute ma reconnaissance va également à Xavier Turon et Pierre Boudry pour avoir accepté de lire ma prose et plus globalement à l'ensemble mon jury, ajoutant Sarah Samadi, Pierre Alex Gagnaire et John Bishop, pour avoir accepté d'évaluer mon travail de thèse.

Je tiens également à remercier Nadia et Nico pour leurs conseils, réflexions et suggestions particulièrement enrichissants, lors des comités de thèse qui ont contribué, j'en suis sûre, à l'orientation et au bon déroulement de cette thèse.

Tout ce travail de thèse n'aurait pas été possible sans l'appui exceptionnel de la team des loulous subaquatiques (officiellement l'équipe de plongée du service mer & observation de la station biologique) qui a contribué à la collecte des données de la majorité des études présentées dans cette thèse : monsieur Fontana, le MacGyver du service, capable de construire un centre commercial avec un coton tige et un couteau suisse ; monsieur Camusat, toujours à l'affût de la « mode » du moment et qui adore en parler (mais on l'aime bien quand même) ; et monsieur Thomas, le paparazzi du service toujours au taquet 3sec avant de plonger (euh c'est quoi la manip ?). Evidemment, je remercie tout particulièrement Laurent (le chef de ces joyeux lurons) pour toute la logistique (heureusement que tu es là !) mais pas que je te remercie pour toute l'aide que tu m'as apporté que ce soit par tes conseils, tes réflexions, les manip terrain et les retours labo (même très tard le soir) : 23000 individus identifiés et 3500 individus disséqués ! Je ne sais pas pour toi, mais moi j'arrête la cione ! Un grand merci à vous 4 pour votre contribution à cette thèse qui, j'en suis sûre, n'aurait pas été la même sans votre aide.

Je remercie également Morgan et Aurélien, les étudiants en stage qui ont contribué à l'acquisition des données d'une partie de cette thèse et tout particulièrement Guillaume, mon tout premier stagiaire (ou « nubien », ça dépend des points de vue) pour toute l'aide que tu m'as apporté au début de ma thèse : les échantillonnages, les retours terrain, les croisements et les manip BM, mais aussi la bonne humeur que tu apportais dans le bureau tous les matins.

Je tiens également à remercier l'ensemble des membres de l'équipe DivCo. J'ai pris (et encore maintenant) un réel plaisir à travailler dans une équipe aussi agréable, jeune (d'esprit) et dynamique. Je tiens particulièrement à remercier Thierry (TeeCee), Thomas, James et Claire pour les relectures de

« dernières minutes » de ce manuscrit. Un merci spécial à TeeCee qui a réussi à émerveiller mes dernières journées en m'apprenant quelques subtilités de World. Quand on parle de Thierry, on ne peut évidemment pas oublier son jumeau (ou amoureux, on se ne le demande toujours !), un grand merci à Christophe (mon acolyte blond) pour les discussions en phylogéo et la bonne humeur que tu apportes tous les jours dans le couloir de l'équipe. Mais aussi merci à Thomas, pour les nourrissages à base de M&Ms lancés depuis le couloir pour éviter la morsure fatale d'un thésard en phase finale de rédaction. Je tiens également à remercier celle qui a toujours été d'une grande aide, aussi bien en BM, en analyses de données que pour me remonter le moral dans les moments difficiles : Charlotte Roby. Un grand merci pour tout ce que tu m'as apporté au cours de ces 3 années.

Bien au-delà de Roscoff, dans les contrées plus chaudes de la Méditerranée, je remercie également Nico, Christelle, Pierre Alex et Cathy pour les réflexions, discussions, analyses de données sur la partie génomique de ma thèse. Je remercie tout particulièrement Cathy qui a réalisé tout le travail sur le choix des SNPs en amont du génotypage. Tu as fait du top boulot !!! Je vous remercie tous pour l'accueil agréable et chaleureux lors du court séjour que j'ai passé en juin 2013. Il n'est plus sétois, mais je ne le remercie pas moins, Camille Roux : un grand merci pour ton aide sur les scripts R (ou pour m'avoir donné tes scripts tout court) et ton soutien au cours de cette thèse. Enfin, il faut toujours finir par le(la) meilleur(e), un grand merci à Flo, mon maître Jedi et thésarde de Fred avant moi, pour ton soutien et ta gaieté. Tu arrives toujours à me redonner du courage même avec un simple email. Merci ma grande !

Outre la partie logistique et scientifique, je tiens à remercier Céline pour sa « patience » dans la gestion des procédures administratives des dossiers des pauvres thésards cherchant désespérément à boucler leurs thèses face la paperasse incessante de l'université pour juste nous réinscrire en 4e année.

Enfin, je remercie toutes les personnes qui m'ont soutenue au cours de cette thèse.... fanny, laure, caro, sab, charlotte, céline, jean-charles, gauthier, camille, marion, manue, stef, guigui, jocelyn, marie (ne m'en voulez pas si j'en oublie). Je tiens également à remercier ma famille et tout particulièrement mes parents et ma sœur qui m'ont toujours soutenus dans mon parcours professionnel et ma passion de la mer et cela depuis que je suis haute comme 3 pommes. Enfin, un dernier mot pour celui qui partage mes journées actuelles et futures.... François, merci pour ton soutien sans faille et merci d'enseigner ma vie....

Dynamique éco-évolutive de deux ascidies congénériques et interfertiles, l'une indigène et l'autre introduite, dans leur zone de sympatrie

RESUME

Les activités humaines sont à l'origine de profondes modifications de la distribution naturelle des espèces. Les introductions d'espèces sont en particulier à l'origine de contacts secondaires entre espèces non isolées reproductivement et ayant divergé en allopatrie. Cette situation est un cas d'étude particulièrement intéressant pour étudier des processus éco-évolutifs, tels que la coexistence d'espèces occupant de même niches écologiques ou les flux de gènes contemporains (i.e. hybridation et introgression) entre espèces indigènes et non-indigènes. Cette thèse s'est ainsi intéressée aux interactions écologiques et génomiques entre deux ascidies congénériques et interfertiles, *Ciona robusta* et *Ciona intestinalis*. Ces deux ascidies, abondantes dans les habitats portuaires, sont en sympatrie en Manche Occidentale suite à l'introduction récente de *C. robusta* (supposée originaire du Pacifique Nord-Ouest) dans l'aire de distribution naturelle de *C. intestinalis*.

Par une étude de la distribution spatiale et temporelle (inter-saisonnière et inter-annuelle) des adultes des deux espèces et de la sédentarisation de leurs juvéniles, nous avons montré que les deux espèces coexistent de façon durable, au sein de communautés similaires, à l'échelle régionale. Elles vivent en syntopie dans la majorité des habitats portuaires étudiés, bien qu'il existe une importante dynamique saisonnière de leur abondance relative : *C. robusta* est surtout présente en fin d'été et en automne, et toujours en moindre abondance par rapport à sa congénère indigène. Cette syntopie, l'interfertilité des deux espèces et le synchronisme de leur maturité sexuelle indiquent un potentiel d'hybridation important entre les deux espèces. L'hybridation réalisée est pourtant faible, comme montré avec quatre marqueurs moléculaires diagnostiques des deux espèces, analysés sur plus de 3000 individus : seulement 4% des individus présentent des génotypes compatibles avec de l'hybridation ou de l'introgression. Ces résultats ont été complétés par une étude de génomique des populations (310 marqueurs SNPs et 450 individus collectés dans différents océans) : ils confirment que les flux de gènes interspécifiques sont très rares. Par ailleurs, les rares locus présentant du polymorphisme partagé montrent un taux d'introgression hétérogène, et l'introgression est également observée dans des localités où seule l'une des espèces existe (ex. côtes américaines et chiliennes). L'ensemble des résultats génétiques et génomiques indiquent que le flux de gènes interspécifique observé résulte d'introgressions anciennes (probablement au Pléistocène) et non contemporaines. Une dernière étude menée à l'échelle mondiale avec des marqueurs mitochondriaux a par ailleurs permis de montrer que les processus d'introduction de *C. robusta* diffèrent selon les régions d'introduction et pose la question du statut réellement non-indigène des deux espèces dans certaines régions.

Ainsi, cette thèse a montré la (quasi)-absence d'hybridation actuelle entre *C. robusta* et *C. intestinalis*, en situation de syntopie. Elle ouvre des perspectives quant à l'étude des mécanismes d'isolement reproductif entre ces deux espèces. La question du devenir à long terme des deux espèces, qui par leur coexistence étroite sont en compétition, est posée. Cette compétition pourrait être modulée par leurs préférences environnementales et les changements climatiques en cours dans l'Atlantique Nord. Enfin, cette thèse illustre comment des processus contemporains et anciens interagissent pour façonner la distribution et l'évolution des espèces, la structure génétique de leurs populations et l'architecture de leur génome.

Mots clés : Contact secondaire, introductions biologiques, ascidie, *Ciona*, hybridation, compétition, génomique, habitats portuaires

ABSTRACT

Human activities severely alter species ranges that have been built on evolutionary time scales, and biological introductions promote secondary contacts between non-reproductively isolated species that were in allopatry. Such a situation is a very interesting case-study to examine eco-evolutionary processes, for instance coexistence between species sharing the same ecological niche or inter-specific gene flow (i.e. hybridization and introgression) between native and non-native species. This PhD thesis studied ecological and genomic interactions between two biologically similar, interfertile and congeneric tunicates, namely *Ciona robusta* and *Ciona intestinalis*. They are both abundant in harbours and marinas. They are sympatric in the Western English Channel because of the recent introduction of *C. robusta* (putatively native to Asia) in the natural range of *C. intestinalis*.

Based on spatial and temporal (seasons and years) adult abundance data and examination of recruitment patterns of the two species, we showed that the two species are sustainably coexisting at a regional scale in Brittany, within similar communities. They live in syntopy in most of the study marinas. However, there are significant changes in their relative abundance through time: *C. robusta* is mostly present at the end of the summer and in the autumn, although always being less abundant than its native congener. Syntopy, interfertility between the two species and synchronous sexual maturity all indicated a high likelihood of hybridization between the two species. The realized hybridization is however very low, as shown by 4 species-diagnostic molecular markers genotyped over more than 3000 individuals: only 4% of the individuals displayed a genotype compatible with hybridization or introgression. This result has been confirmed with a population genomics study (310 SNPs; 450 individuals collected worldwide); inter-specific gene flow is very low. In addition, the few loci showing shared polymorphism displayed variable introgression rates and introgression was observed even in allopatric localities (where only one of the two species exists nowadays). Overall, the genetic and genomic results indicate that interspecific gene flow is most likely due to past introgression events (that may have occurred during the Pleistocene). Finally, a study carried out at a worldwide scale with two mitochondrial loci, showed that the introduction processes of *C. robusta* are different among the introduced regions. This study also questions the non-native status of the two *Ciona* species in some regions.

This work showed the near absence of contemporary hybridization between *C. robusta* and *C. intestinalis*, even in syntopy, opening new research perspectives about the mechanisms preventing their reproduction in the wild. It also questions the fate of these two competing species; this competition may depend on the interaction between their specific environmental preferences and on on-going climatic changes in the North Atlantic. Altogether, this work illustrates the interplay between contemporary and past processes on species distribution and evolution, population genetic structure and genomic architecture.

Keywords : Secondary contacts, biological invasions, ascidian, *Ciona*, hybridization, competition, genomics, marinas